

Endogene Plasmide
in
Dictyostelium discoideum

Birgit A. Metz

Diss
München
1984

Endogene Plasmide in Dictyostelium discoideum

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät der Biologie
der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Birgit A. Metz

erster Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf
zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. C.N. David
Sondergutachter: Prof. Dr. K.L. Williams
Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorgelegte Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Dr. K.L. Williams danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für die hervorragende Betreuung und für die zahlreichen anregenden und kritischen Diskussionen, die zum Fortgang der Arbeit entscheidend beitrugen.

Herrn Prof. Dr. K. Wolf möchte ich ganz herzlich für die Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich der Biologie und stimulierende Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. G. Gerisch danke ich für das Interesse an meiner Arbeit.

Allen meinen Freunden und Kollegen, insbesondere Drs. A. Noegel, D.L. Welker und K.-P. Hirth, die durch kritische Anregungen und bereitwillige Hilfe zu dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit herzlich danken.

Die in Kapitel 4.3 zusammengefaßten Ergebnisse sind teilweise in Zusammenarbeit mit Dr. T.E. Ward entstanden.

Die genetischen Untersuchungen, die in Tab.1 dargestellt sind, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. D.L. Welker durchgeführt.

Die elektronenmikroskopische Analyse wurde durch die Zusammenarbeit mit Dr. M. Claviez möglich.

Ein Teil der in dieser Arbeit dargestellten Daten wurde bereits veröffentlicht (s. Literaturverzeichnis: Metz et al., 1982 und 1983).

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einführung	3
3 Theoretisches Kapitel	9
3.1 Asexueller Lebenszyklus	10
3.2 Parasexueller Lebenszyklus und genetische Analyse	14
3.3 Sexueller Lebenszyklus	18
3.4 Anzucht im Labor	21
3.5 Molekulargenetik	24
4 Ergebnisse	36
4.1 Cobaltresistenz	36
4.1.1 Cobaltresistenz in <u>Klebsiella aerogenes</u>	36
4.1.2 Instabile Cobaltresistenz in <u>Dictyostelium discoideum</u> -Stamm HU32	36
4.1.3 Axenisches Wachstum von <u>Dictyostelium discoideum</u> , insbesondere von Stamm HU32 in Gegenwart von CoCl_2	42
4.2 Entwicklung der Methode zur Plasmidisolierung in <u>Dictyostelium discoideum</u> Stamm HU32	46
4.2.1 Probleme bei der Plasmidisolierung	47
4.2.2 Reinigung der Plasmid-DNA	49
4.3 Charakterisierung von <u>Dictyostelium discoideum</u> -Plasmid Ddp1 aus Stamm HU32	54
4.3.1 Lokalisierung von Ddp1 in der Zelle	54
4.3.2 Elektronenmikroskopische Analyse von Ddp1	56
4.3.3 Identifizierung des Bandenmusters von Ddp1	58
4.3.4 Restriktionsmuster und Restriktionskarte,	

Klonierung von Ddp1	61
4.3.5 Vergleich von Ddp1 aus axenisch und auf festem Medium angezogenen HU32-Zellen	66
4.3.6 Vergleich von Ddp1 mit <u>Klebsiella aerogenes</u> -Plasmid pTW16	68
4.3.7 Vergleich mit anderen extrachromosomalen Elementen	70
4.3.8 Kopienzahl von Ddp1 aus HU32	74
4.3.9 Integrierte Kopie von Ddp1	79
4.4 Plasmid in anderen Stämmen	80
4.5 Plasmidspezifische Transkripte	92
4.6 Verwendung von Ddp1 in einem Transformationssystem	98
5 Diskussion	104
5.1 <u>Dictyostelium discoideum</u> -Plasmide	104
5.2 <u>Dictyostelium discoideum</u> -Plasmide : Vergleich mit anderen eukaryontischen Plasmiden	106
5.2.1 Nukleare Plasmide	106
5.2.2 Mitochondrielle Plasmide	110
5.3 Funktion der <u>D. discoideum</u> -Plasmide unter besonderer Berücksichtigung von Ddp1 und seiner Assoziation mit der instabilen Cobaltresistenz (cob-354)	111
5.3.1 Chromosomale Cobaltresistenz in <u>Dictyostelium discoideum</u>	112
5.3.2 Mechanismen der Schwermetallresistenz unter besonderer Berücksichtigung der Cobaltresistenz	113
5.3.3 Instabile Cobaltresistenz in <u>Dictyostelium discoideum</u>	115

5.4 Transformation in <u>Dictyostelium discoideum</u> ;	
Vektorkonstruktion	118
6 Material und Methode	126
6. 1 Chemikalien, Abkürzungen und Geräte	126
6. 2 Allgemeine Bemerkungen	127
6. 3 Liste der verwendeten Stämme	128
6.3.1 Bakterienstämme zur Anzucht von	
<u>Dictyostelium discoideum</u>	128
6.3.2 Bakterien-Stämme zur Transformation	128
6.3.3 <u>Dictyostelium discoideum</u> -Stämme	
(s. Appendix)	129
6. 4 Lösungen	129
6. 5 Kulturmedien	132
6. 6 Kulturbedingungen von <u>Dictyostelium discoideum</u>	133
6.6.1 Lagerung	133
6.6.2 Anzucht auf festem Medium (SM; in Gegen-	
wart von Bakterien)	134
6.6.3 Axenische Kulturen	
(bakterienfreie Flüssigkultur)	134
6.6.4 Methoden der parasexuellen Genetik	135
6.6.5 Überprüfen der instabilen dominanten	
Cobaltresistenz (cob-354)	136
6.6.6 Ernten	136
6.6.7 Zellfraktionierung	137
6.6.7.1 Isolierung von Zellkernen	137
6.6.7.2 Zellfraktionierung durch sequentielle	
Zentrifugation	137
6. 7 DNA-Isolierung aus <u>Dictyostelium discoideum</u>	138

6.7.1 Plasmidpräparation	138
6.7.2 Reinigung von Plasmid-DNA	138
6.7.3 Isolierung genomischer DNA	140
6. 8 Restriktionsenzymverdau	141
6. 9 Agarosegelelektrophorese	141
6.10 Southern blot-Analyse	142
6.10.1 Denaturierung von Agarosegelen	142
6.10.2 Southern Transfer	142
6.10.3 Nick-translation der Probe	143
6.10.4 Reinigung und Denaturierung der Probe	143
6.10.5 Vorhybridisierung und Hybridisierung des Southern blots	144
6.10.6 Waschen des Nitrozellulosefilters	144
6.10.7 Röntgenfilmanalyse	145
6.11 Nachweis von Plasmid-DNA in <u>Dictyostelium</u> <u>discoideum</u>	145
6.11.1 Plasmidpräparation	145
6.11.2 Isolierung eines rohen DNA-Extraktes zur "Koloniehybridisierung"	145
6.11.3 <u>In situ</u> -Lyse-Gele	146
6.12 Anzucht und Plasmidisolierung aus Bakterien	146
6.12.1 Lagerung	146
6.12.2 Anzucht	146
6.12.3 Plasmidisolierung	146
6.12.3.1 Präparative Plasmidisolierung	146
6.12.3.2 Minipräparationen	147
6.13 Klonierung	147
6.13.1 Ligation	147

6.13.2 Transformation	147
6.14 RNA-Charakterisierung in <u>Dictyostelium discoideum</u>	148
6.14.1 RNA-Isolierung	148
6.14.2 Auftrennung von RNA und Northern blot-Analyse	149
6.15 Elektronenmikroskopische Analyse von Plasmid-DNA	149
7 Literatur	151
8 Appendix	167
8.1 Liste der Loci von <u>Dictyostelium discoideum</u>	167
8.2 Liste der Wildtypstämme von <u>Dictyostelium discoideum</u>	172
8.3 Genotypen von <u>Dictyostelium discoideum</u> -Stämmen	173
Lebenslauf	176

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden die Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung eines Plasmids in dem Eukaryonten Dictyostelium discoideum beschrieben. Zur Isolierung mußten Methoden ausgearbeitet werden, die es nun ermöglichen, routinemäßig Plasmid-DNA aus D. discoideum zu isolieren.

In D. discoideum Stamm HU32 wurde ein endogenes Plasmid Ddp1 gefunden, das mit einer instabilen Cobaltresistenz (cob-354) assoziiert ist, die nicht chromosomal kartiert werden konnte. Zwischen der cob-354-Mutation in HU32 und der chromosomalen Cobaltresistenz (cobA) besteht kein Zusammenhang. Ddp1 ist im Zellkern lokalisiert und hat eine hohe Kopienzahl (~150-200 Kopien/Zelle). Das Plasmid liegt hauptsächlich als Monomer vor. Eine chromosomale Kopie dieses Plasmids konnte nicht nachgewiesen werden.

Ddp1 wurde in pBR322 kloniert und eine Restriktionskarte wurde aufgestellt. Weiterhin wurden auch Fragmente des Plasmids in dem bakteriellen Vektor pBR322 kloniert.

In den beiden cobaltsensitiven Wildtypstämmen NC4 und V12 konnten sehr ähnliche, wenn nicht identische Plasmide nachgewiesen werden, welche in vergleichbar hoher Kopienzahl wie Ddp1 in HU32 vorliegen und ebenfalls im Kern lokalisiert sind; sie wurden Ddp2 bzw. Ddp3 genannt.

HU32 kann sowohl durch Anzucht auf festem Medium in Gegenwart von Bakterien, als auch in bakterienfreier (axenischer) Flüssigkultur unter nicht selektiven Bedingungen (ohne Zusatz von CoCl_2) von der instabilen Cobaltresistenz geheilt werden. Diese Heilung ist mit dem

Verlust von Ddp1 verbunden.

Die Selektion axenischer Mutanten, und damit die Anzucht in bakterienfreier Flüssigkultur, führt generell zum Verlust der Plasmide Ddp2 und Ddp3. Der Stamm HU32 ist damit der einzige Stamm, der in axenischem Medium zur Plasmidisolierung verwendet werden kann. Es muß jedoch durch die Gegenwart von CoCl_2 auf die Beibehaltung von Ddp1 selektioniert werden.

Um einen Einblick in den Mechanismus der Cobaltresistenz zu erhalten, wurde versucht, plasmidcodierte Transkripte zu identifizieren. Es gibt Hinweise, daß das prominenteste Ddp1-Transkript schon in vegetativen Zellen vorliegt, wogegen es in NC4 und V12 erst während der Entwicklung (d.h. wenn der Zellkontakt etabliert ist) nachweisbar ist.

Aus anderen Wildtypstämmen konnten ebenfalls Plasmide isoliert werden, die nicht identisch sind mit den in dieser Arbeit beschriebenen; zwischen diesen Plasmiden untereinander und Ddp1 bestehen keine Homologien (Welker et al., in Vorber.).

Die Isolierung von Plasmiden aus D.discoideum bilden die Grundlage zur Etablierung eines Transformationssystems in D.discoideum. Damit wiederum ist das Studium entwicklungsabhängiger Genregulation und -expression in D.discoideum ermöglicht.

2 Einführung

Plasmide sind in Prokaryonten weit verbreitet. Es handelt sich dabei um extrachromosomal vorliegende, meist circular vorliegende DNA-Species, die zur autonomen Replikation befähigt sind. Sie wurden aufgrund von Fertilitäts- und Resistenzeigenschaften entdeckt (Goebel, 1973). Nachdem die Methoden zur Plasmidisolierung ausgearbeitet waren, wurde die Verbreitung von Plasmiden in Prokaryonten (Sherratt, 1982) und Archaeobakterien (z.B. Yeats et al., 1982) offensichtlich.

Der Ursprung von Plasmiden ist unklar. Sie weisen keine Homologien zu dem bakteriellen Chromosom auf. Ihre Größe schwankt zwischen ~1 und >230kbp. So ist das ColE1-Plasmid in Escherischia coli mit einer Größe von 6.3kbp ein Beispiel für ein relativ kleines Plasmid (Dougan et al., 1978), wogegen die Ti-Plasmide aus Agrobacterium tumefaciens am anderen Ende der Größenskala sind (Drummond, 1979; Bevan & Chilton, 1982). Plasmide haben oft keine offensichtliche Funktion. Die Plasmide, die jedoch eine Funktion codieren, sind für das betreffende Bakterium nicht essentiell, geben ihm aber die Möglichkeit, sich in ökologischen Nischen auszubreiten (Sherratt, 1982). Beispiele solcher Funktionen sind Antibiotika- (Davies & Smith, 1978) und Schwermetallresistenzen (Summers & Silver, 1978). So ist z.B. Arsenat- und Antimonresistenz in E.coli plasmidcodiert (Silver & Keach, 1982; Mobley & Rosen, 1982). Plasmide sind auch an der Stickstofffixierung - z.B. in Rhizobium meliloti und Klebsiella pneumoniae - beteiligt (Ausubel, 1982; Ruvkun et

al., 1982). Einen besonderen Fall stellen Ti-Plasmide in A.tumefaciens dar: dieses Bakterium befällt dicotyle Pflanzen und verursacht den Gallentumor, wobei Teile des bakteriellen Plasmids in das eukaryontische Wirtsgenom integrieren (Drummond, 1979; Bevan & Chilton, 1982). Interessanterweise sind die Bakterien R.meliloti und A.tumefaciens, sobald sie von ihren Plasmiden geheilt sind, kaum noch zu unterscheiden (Sherratt, 1982).

In den letzten Jahren konnten Plasmide, bzw. Plasmid-ähnliche DNA in zunehmenden Maß in Eukaryonten nachgewiesen werden (Tudzynski, 1982; Esser et al., 1983), wobei die meisten in den Mitochondrien lokalisiert sind. Einige verfügen über Homologien zu dem mitochondriellen (mt) Genom und andere nicht. So entstehen z.B. in dem filamentösen Ascomyceten Podospora anserina während der Seneszenz durch Excision aus dem mitochondriellen Genom circulaire DNA-Moleküle (Kück et al., 1981), wobei sich spezifische Transkripte, sowohl in dem jungen, als auch in dem alten Mycel nachweisen lassen (Wright & Cummings, 1983). In Neurospora crassa wurden dagegen in den Mitochondrien lokalisierte Plasmide gefunden, die keine Homologien mit dem mt-Genom aufweisen (Stohl et al., 1982).

Das am besten untersuchte Beispiel für ein im Zellkern lokalisiertes Plasmid ist das 2µm-Plasmid in Saccharomyces cerevisiae (Broach, 1981). Es ist mit einem prokaryontischen Plasmid vergleichbar, da keine chromosomale Kopie nachweisbar ist und es für keine essentiellen Funktionen

codiert (Broach, 1981). Die bisher nachgewiesenen Genprodukte des Plasmids sind nur zu seiner Erhaltung notwendig (Jayaram et al., 1983). Auf das 2 μ m-Plasmid wird in der Diskussion noch ausführlicher eingegangen.

Ein weiteres Beispiel für ein im Kern lokalisiertes Plasmid ist *copia* in *Drosophila melanogaster*. Jedoch sind in der chromosomalen DNA mehrere Kopien zu finden, und die circulären *copia*-Moleküle werden nur als Übergangsstadien in der Transposition angesehen (Flavell & Ish-Horowicz, 1981). Es gibt Hinweise, daß die circulären Elemente replizierfähig sind, und damit autonome Replikation von in *copia* klonierter DNA möglich ist (Sinclair et al., 1983).

Durch die Existenz von Plasmiden in Verbindung mit rekombinanter Gentechnologie sind die Möglichkeiten der Transformation sehr erweitert worden. Es wurden Untersuchungen - zunächst in Prokaryonten und dann auch in *S.cerevisiae* - durchgeführt, die einen großen Beitrag zur Aufklärung der Genstruktur und Genregulation lieferten (Struhl, 1983).

Der zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ist ein beliebtes Modellsystem der Entwicklung (s.Abb.1): einzelne Amöben, die sich durch die Phagozytose von Bakterien (z.B. *Klebsiella aerogenes*) ernähren, durchlaufen, sobald die Nahrung aufgebraucht ist, einen einfachen Entwicklungszyklus: unter dem Einfluß von cyclischem Adenosin-3'5'-monophosphat (cAMP) kommt es zur Ausbildung von Zellaggregaten, in denen sich die beiden Hauptzellpopulationen, die "prestalk"- und die "prespore"-Zellen entwickeln, die sich

bei der Kulmination des Fruchtkörpers in die Stiel- (stalk) bzw. Sporenzellen (spore cells) differenzieren. Aus jeder Spore kann eine Amoebe auskeimen, die wieder diesen einfachen asexuellen Lebenszyklus durchlaufen kann (Bonner, 1967).

Mit Hilfe der endogenen D.discoideum-Plasmide ist es nun möglich, Vektoren zu konstruieren, die den Aufbau eines D.discoideum-Transformationssystems ermöglichen; damit könnte die entwicklungsregulierte Genexpression im Detail auf molekularer Ebene untersucht werden.

In dieser Arbeit wird die Entdeckung und Charakterisierung eines endogenen Plasmids in dem zellulären Schleimpilz D.discoideum beschrieben. Das Plasmid ist durch die Assoziation mit einer instabilen Cobaltresistenz (cob-354) gefunden worden, die sich nicht chromosomal kartieren läßt. Weitere Plasmide wurden aus verschiedenen D.discoideum-Wildtypstämmen isoliert; ihre Funktion ist bisher unklar (Welker et al., in Vorber.).

In Eukaryonten ist der Mechanismus für einige Schwermetallresistenzen geklärt. So ist z.B. Cadmiumresistenz in Mauszellen durch Amplifizierung des Metallothionein-I-Gens (Beach & Palmiter, 1981). Ähnliche Prozesse führen in S.cerevisiae zu Kupferresistenz (Fogel & Welch, 1982; Fogel et al., 1983).

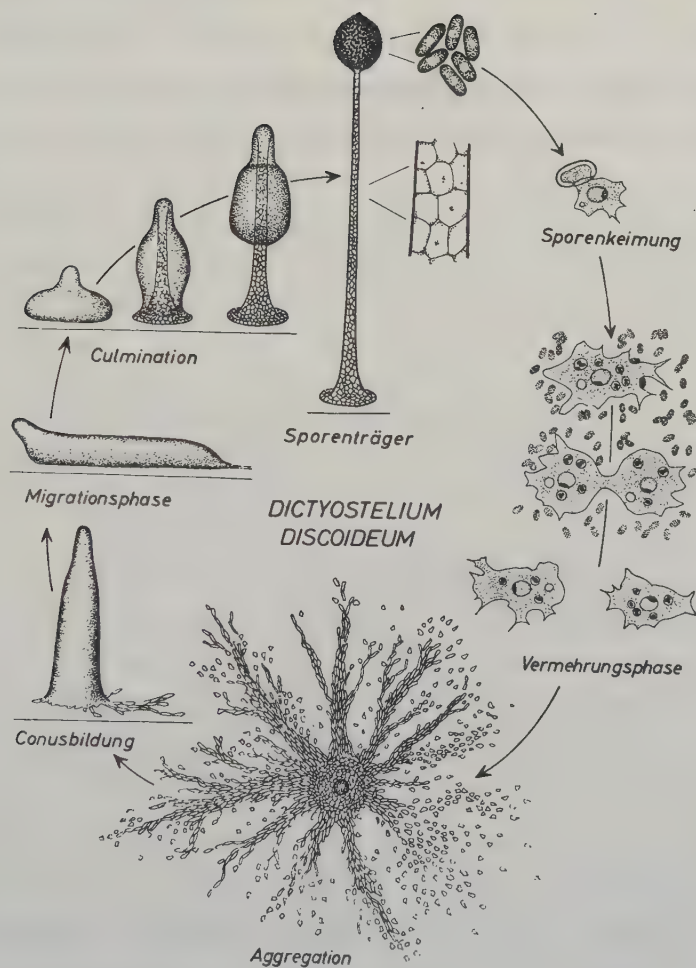


Abb.1. Asexueller Lebenszyklus von D. discoideum (aus Gerisch, 1964; Erläuterungen s. Text).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Mechanismus der Cobaltresistenz der cob-354-Mutation in D.discoideum nicht nur auf Cobalt beschränkt ist, sondern gleichzeitig auch den Phänotyp von Coumarinsensitivitätsmutationen unterdrückt (s. Ergebnisse). Dieses Verhalten könnte z.B. durch eine Veränderung eines Permease/Aufnahme-Mechanismus erklärt werden.

3 Theoretisches Kapitel

Dictyostelium discoideum: Biologie und Genetik eines niedrigen Eukaryonten

Schleimpilze sind niedrige Eukaryonten ohne Zellwand, die die typischen eukaryontischen Zellorganellen, wie Nukleus und Mitochondrien besitzen. Systematisch sind sie in der Unterabteilung der Mycetozoa in der Abteilung der Gymnomyxa eingeordnet (Olive, 1975). Olive teilt die Schleimpilze folgendermaßen ein (Olive, 1975):

Reich: Protista

Abteilung: Euprotista

die meisten Protozoen, z.B. Tetrahymena,
und einfache Algen,

Abteilung: Gymnomyxa

Unterabteilung: Mycetozoa

Klasse: Eumycetozoa

Unterklasse: Protostelia

z.B. Protostelium

Unterklasse: Dictyostelia (dictyostelide,
zelluläre Schleimpilze)

Unterklasse: Myxogastria (echte Schleimpilze),
z.B. Physarum

Klasse: Acrasea (acraside, zelluläre Schleimpilze)
z.B. Acrasis

Unterabteilung: Plasmodiophorina

Klasse: Plasmodiophorea

Unterabteilung: Labyrinthulina

Klasse: Labyrinthulea

Der erste zelluläre Schleimpilz wurde 1869 von O. Brefeld entdeckt (Brefeld, 1869; 1884). Es handelte sich dabei um Dictyostelium mucoroides. Brefeld meinte, einen plasmodialen Schleimpilz, wie z.B. Physarum, gefunden zu haben. Erst später wurde gezeigt (van Tieghem, 1880), daß in dem asexuellen Zellaggregat von D. mucoroides die einzelnen Zellen erhalten bleiben; Wallace und Raper (1979) konnten

schließlich zeigen, daß nur im dem sexuellen Lebenszyklus bei der Makrozystenbildung ein echtes Plasmodium entsteht. In der Gattung Dictyostelium sind 19 Arten bekannt. D.discoideum wurde von Raper entdeckt (Raper, 1935) und ist in der Natur weniger weit verbreitet als D.mucoroides (Olive, 1975).

In dem Pseudoplasmodium von D.discoideum (und auch D.polycephalum) liegen die beiden Hauptzellpopulationen (die prespore- und prestalk-Zellen, s.u.) getrennt vor (Olive, 1975) und es kann eine "Wanderphase" durchlaufen. Bei den anderen Dictyosteliden differenzieren sich die Stielzellen durch das ganze Pseudoplasmodium hindurch. Damit sind in D.discoideum z.B. Transplantationsversuche möglich. So wurde D.discoideum zu einem beliebten Untersuchungsobjekt und einfachen Modellsystem für Entwicklung (Olive, 1975; Sussman, 1982).

Unter natürlichen Bedingungen lebt D.discoideum im Waldboden oder auf abgestorbenem, organischen Material durch Phagozytose von Bakterien. Es wurden verschiedene Wildtypstämme isoliert, wovon die bekanntesten die Stämme NC4 und V12 sind (Raper, 1951). In der Natur ist D.discoideum fast ausschließlich haploid zu finden, obwohl Diploide relativ stabil sind und wie haploide Zellen den asexuellen Lebenszyklus durchlaufen können (s.u.).

3.1 Asexueller Lebenszyklus

Im asexuellen Lebenszyklus durchläuft D.discoideum die

Entwicklung zwischen der Dauerform der Spore, aus der die Amoebe auskeimt, bis zum Fruchtkörper (s. Abb.1). Keimung wird im Labor durch eine kurze Inkubation bei 44°C gefördert (Cotter et al., 1979). Für das Wachstum ist Feuchtigkeit, Nahrung und eine Temperatur zwischen 12 und 27°C erforderlich. Die Amoeben haben einen Durchmesser von etwa 10µm und vermehren sich durch mitotische Teilungen. Sie phagozytieren bevorzugt gramnegative Bakterien wie Escherichia coli und Klebsiella aerogenes (Raper, 1937; Raper, 1951). Grampositive Bakterien können auch als Nahrungsquelle verwendet werden, jedoch ist auf ihnen im allgemeinen das Wachstum weniger gut als auf gramnegativen Bakterien. Wachstum auf Bacillus subtilis (grampositiv) wird als Marker in der parasexuellen Genetik verwendet (Newell et al., 1977; Welker & Williams, 1980b).

Die Generationsdauer des Wildtypstammes NC4 liegt bei optimaler Wachstumstemperatur (zwischen 23 und 25°C) bei 3 bis 4 Stunden (Raper, 1937). Sobald die Nahrung aufgebraucht ist (t_0), beginnt die Entwicklung. Die Zellen gehen in das präaggregative Stadium über, das ungefähr 4 bis 8 Stunden dauert, und in dem die Zellen cAMP-sensitiv werden. Anschließend bilden sich Aggregationszentren (Bonner, 1947), wobei einige beliebige Zellen eine chemoattraktive Substanz abgeben. Sie wurde von Bonner zunächst als Acrasin (Bonner, 1949) bezeichnet und konnte später als cAMP (Konijn et al., 1967) identifiziert werden. cAMP wird in Pulsen abgegeben und breitet sich wellenförmig aus. Nur sensibilisierte Zellen werden von einem Aggregationszentrum angezogen

(Müller et al., 1979). Gegen Ende der Aggregationsphase (nach ~12-15h) wird von den Zellen in dem Aggregat eine Schleimschicht sekretiert, die die aus 10^4 bis 5×10^5 bestehende Zellmasse mechanisch schützt. Das Pseudoplasmodium kann sofort kulminieren und einen Fruchtkörper ausbilden, oder es kann eine "Wanderphase" eingeschoben werden. Im letzteren Fall spricht man von dem migrierenden Pseudoplasmodium oder dem "slug". Der "slug" läßt während der Migrationsphase eine Schleimspur hinter sich, die aus kollabierter Schleimhülle besteht. Die Migration wird gefördert durch Feuchtigkeit, niedrige Salzkonzentrationen und seitliche Belichtung, wogegen hohe Salzkonzentrationen und Licht von oben die Fruchtkörperbildung fördert (Newell et al, 1969). Der "slug" ist ebenso wie die Amöben zu Photo- und Thermotaxis fähig (Poff & Whitaker, 1979; Fisher et al., 1981; Fisher & Williams, 1982; Hong et al., 1981 und 1983; Häder et al., 1983).

Im Pseudoplasmodium kommt es zu einer Musterbildung (Gross et al., 1981) wobei sich die beiden Hauptzelltypen differenzieren: Im vorderen Teil befinden sich die "prestalk"-, im hinteren Teil die "prespore"-Zellen. Die Zellen an der Spitze werden als "tip"-Zellen bezeichnet. Es ist bisher unklar, ob sie eine weitere Subpopulation bilden, oder ob sie mit den "prestalk"-Zellen identisch sind. Am Ende des slugs, aber auch zwischen den "prespore"-Zellen eingestreut, befinden sich die sog. "anterior-like" Zellen (Sternfeld & David, 1981 und 1982), welche mit den "prestalk"-Zellen fast identisch sind (Voet et al., einge-

reicht).

Während der Kulmination wandern die "prestalk"-Zellen durch das Pseudoplasmodium - innerhalb eines Zylinders aus u.a. Cellulose und Mucopolysacchariden, der von den Stielzellen abgeschieden wird - hindurch und differenzieren sich zu Stielzellen. Es kommt zunächst zur Ausbildung einer Struktur, die mit einem "mexican hat" vergleichbar ist (Sussman, 1982). Das Sorogen erhebt sich über das Substrat und der Stiel wird äußerlich sichtbar. Die Stielzellen vakuolisieren immer stärker, wobei sie ihre eigene Zellwand bilden. Schließlich degenerieren die Zellkerne und die Zellen sterben ab (Olive, 1975; Sussman, 1982). Aus einem Teil der anterior-like-Zellen differenzieren sich die Zellen, die die Basalplatte bilden. Diese ist ein Charakteristikum von D.discoideum (Sussman, 1982).

Gleichzeitig entwickeln sich auch die "prespore"-Zellen. In ihnen gibt es besondere Strukturen, die "prespore"-Vakuolen, welche eine leichte Unterscheidung der Zelltypen ermöglichen (Sussman, 1982). Der Inhalt dieser Vakuolen wird an die Zellwand abgegeben und trägt zum Aufbau der Sporenwand bei. Die Sporenhülle besteht u.a. aus Hemicellulosen, Cellulose und Protein (Orlowski und Loomis, 1979; Sussman, 1982). Der Sorus, der im Wildtyp weiß-gelblich bis gelb ist, beinhaltet ovale bis elliptische Sporen. Das sich entwickelnde Sorokarp ist von einer dünnen Schleimschicht umgeben, die nach Reifung der Sporen aufbricht.

Unter günstigen Umweltbedingungen können die Sporen keimen und den asexuellen, parasexuellen oder sexuellen

Lebenszyklus durchlaufen (s.u.).

3.2 Parasexueller Lebenszyklus und genetische Analyse

Die genetische Analyse basiert auf dem parasexuellen Lebenszyklus (s. Abb.2). Sie läuft über folgende vier Schritte ab (Katz & Sussman, 1972; Newell, 1978):

- Selektion einer heterozygoten Diploiden
- mitotisches crossing-over
- Selektion segregierender Haploider
- Bestimmung des Genotypes der Haploiden

D.discoideum verfügt über einen haploiden Chromosomensatz von $n=7$, wobei die einzelnen Metaphase-Chromosomen eine Größe von ungefähr $2\mu\text{m}$ haben und aufgrund ihrer Form und ihres Bandenmusters nach Giemsa-Färbung identifiziert werden können (Robson & Williams, 1977).

Haploide Zellen des gleichen Paarungstyps fusionieren über Plasmogamie und Karyogamie zu einer heterozygoten Diploiden (Newell, 1978; s. Abb.2). Durch Schütteln wird eine Koaggregation der Zellen ermöglicht, wobei Calcium einen fördernden Effekt hat; die spontane Fusionsfrequenz koaggregierter Zellen ist abhängig vom Genotyp und liegt zwischen 10^{-4} und 10^{-6} . Die Frequenz der Diploidenbildung ist - verglichen mit der Fusion von Zellen mit verschiedenem Paarungstyp bei der Makrocystenbildung - niedrig (s.u.). Deshalb ist die Selektion von Diploiden unter Bedingungen, bei denen die beiden haploiden Elternstämme nicht wachsen können, erforderlich; sie erfolgt über Komplementation nicht

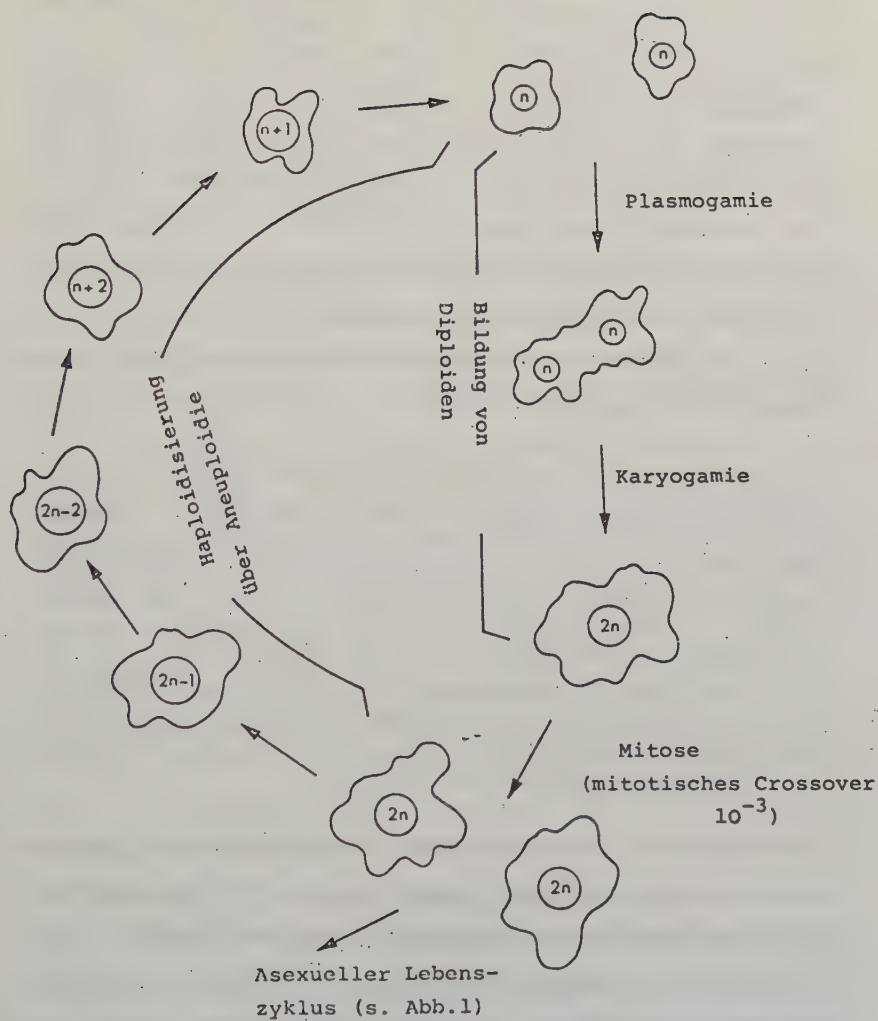


Abb.2. Parasexueller Lebenszyklus von D. discoideum.
Erläuterungen s. Text.

alleler, rezessiver, konditional letaler Mutationen (Newell, 1982). Bei Kreuzungen mit nicht markierten Wildtypstämmen wird ein Testerstamm mit einer dominanten und einer zusätzlichen rezessiven, konditional letalen Mutation verwendet (z.B. HU32 und davon abstammende Stämme mit dominanter Cobaltresistenz, s. auch 4.1; Williams, 1978).

Die Diploiden sind doppelt so groß wie die Haploiden (Stenhouse & Williams, 1981) und können im diploidem Zustand den asexuellen Lebenszyklus durchlaufen. Bei der Mitose der Diploiden ereignet sich mitotisches crossing-over mit einer Frequenz von ungefähr 10^{-3} .

Die Diploiden haben die Tendenz, mit einer Frequenz von 10^{-3} zu haploidisieren. Dieser Vorgang kann durch Benzimidazol-Derivate, wie z.B. Benlate und Thiabendazol, beschleunigt werden (Welker & Williams, 1980c). Es handelt sich dabei u.a. um Fungizide, die einen Effekt auf die Ausbildung des Spindelapparates bei der Mitose haben und welche über Non-disjunction und instabile Aneuploidie zu haploiden Zellen führen (Newell, 1978).

Die Nomenklatur der verschiedenen Wildtypstämmen erfolgte zunächst nach dem Fundort. Später wurden Standardlaborstämmen z.B. nach der Fähigkeit axenisch zu wachsen benannt (z.B. AX2 und AX3). Inzwischen wurde eine Nomenklatur eingeführt, die analog zu dem in Bakterien entwickelten System von Demerec ist (Demerec et al., 1966). In unserem Labor werden haploide mit HU, und diploide Stämme mit DU und einer fortlaufenden Nummer gekennzeichnet. Haploid sind weiterhin

Stämme mit der Bezeichnung AX, X oder NP, sowie die Wildtypstämme. Eine neue Mutation wird zunächst mit der Abkürzung des Phänotyps und einer Nummer gekennzeichnet (z.B. cob-300 für Cobaltresistenz. Falls sich die Mutation einem Locus zuordnen läßt, der bereits auf einer Kopplungsgruppe kartiert ist, wird dieser durch einen Buchstaben spezifiziert (z.B. cobA300).

Durch genetische Analyse war es möglich, eine Karte mit etwa 100 Loci auf sechs der sieben Kopplungsgruppen aufzustellen (Newell, 1982; Welker & Williams, nicht veröffentl.); als Marker dienen z.B. Farbmutationen, Resistenz gegen Cycloheximid, Cobalt u.s.w. (s. Appendix, Liste von Loci; Welker & Williams, 1982a). Weiterhin konnte die relative Anordnung verschiedener Markergene auf verschiedenen Kopplungsgruppen durch mitotisches crossing-over bestimmt werden (Welker & Williams, 1982a). Relativ instabile chromosomale Abnormalitäten, wie ein Fragmentchromosom (Williams et al., 1980), ein Fusionschromosom ($n=6$ anstelle von $n=7$; Welker & Williams, 1981) sowie eine Tandemduplikation auf Kopplungsgruppe III (Welker et al., 1982) konnten nachgewiesen und charakterisiert werden.

Translokationen verursachen Kosegregation von Kopplungsgruppen und ereignen sich im parasexuellen Lebenszyklus mit einer Häufigkeit von ungefähr 1% (Welker & Williams, in Vorber.). Eine Translokation ist wahrscheinlich auch die Ursache für die Schwierigkeiten bei der Zuordnung von Markern zur Kopplungsgruppe V (D.Welker, pers. Mitt.).

3.3 Sexueller Lebenszyklus

D. discoideum kann aus der vegetativen Vermehrungsphase nach Aufbrauchen der Nahrung auch in den sexuellen Lebenszyklus übergehen und Makrozysten bilden (s. Abb. 3). Weitere Faktoren, die die Makrozystenbildung positiv beeinflussen, sind Dunkelheit, Feuchtigkeit und ein niedriger Phosphatgehalt; Ca^{++} hat auch hier - wie bei der parasexuellen Fusion - einen fördernden Effekt (Weinkauff & Filosa, 1965; Erdos et al., 1973; Newell, 1978; Robson & Williams, 1979). Es konnte gezeigt werden, daß praktisch jede Zelle zur Makrozystenbildung befähigt ist (Robson & Williams, 1981).

Die meisten Stämme von D. discoideum sind heterothallisch, und so sind Zellen von verschiedenem Paarungstyp notwendig, um den sexuellen Zyklus einzuleiten (z.B. NC4, matA1 und V12, matA2). Es gibt jedoch auch homothallische Stämme (z.B. AC4), in denen wahrscheinlich beide Paarungstypen exprimiert sind (Robson & Williams, 1980).

Der Paarungstyp-Locus ist assoziiert, wenn nicht identisch, mit einem vegetativen Inkompatibilitätslocus auf Kopplungsgruppe I (Welker & Williams 1982a). Die vegetative Inkompatibilität ist verantwortlich für die extrem niedrige Frequenz ($\sim 10^{-8}$), mit der bei der parasexuellen Fusion Diploide zwischen Zellen mit verschiedenem Paarungstyp gebildet werden. In den dabei entstehenden "escaped diploids" wird dabei der Locus durch mitotisches crossing-over homozygot (Robson & Williams, 1979 & 1980). Bei dem Kreuzungstyp (und der vegetativen Inkompatibilität) handelt es sich damit

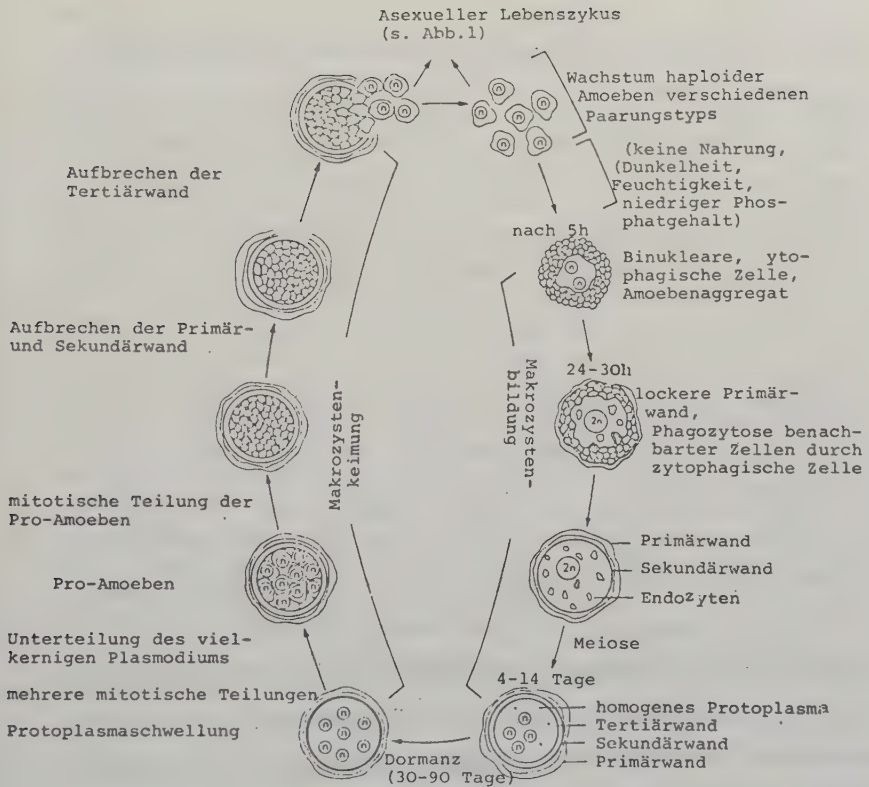


Abb.3. Sexueller Lebenszyklus (Erläuterungen s. Text).

wahrscheinlich um ein 1 Locus- 2 Allele-System. Es gibt jedoch einige Ergebnisse, die die Existenz eines zweiten Paarungstyp-Locus nicht ausschließen (Williams, nicht veröffentlicht).

Die Makrozystenbildung wird eingeleitet durch die Bildung einer großen, binuklearen Zelle, die wahrscheinlich durch Fusion von zwei Zellkernen mit verschiedenen Paarungstypen entstanden ist. Nach der Fusion der Zellkerne wird die Zelle zytophagisch; sie nimmt mehrere hundert Amöben auf und es wird eine lockere Primärwand abgelagert. Die phagozytierten Zellen werden in Vakuolen eingeschlossen und verdaut. Es schließt sich die Ablagerung einer festen Sekundär- und Tertiärwand an. Wahrscheinlich überlebt nur eines der vier meiotischen Produkte (Wallace & Raper, 1979). Die Makrozysten keimen erst nach einer mehrmonatigen Keimungsruhe und mit niedriger Effizienz. Es wurde versucht, die Keimungsruhe der Makrozysten z.B. durch Inkubation bei verschiedenen Temperaturen zu verkürzen, um damit eine Erhöhung und verlässliche Keimungsfrequenz zu erhalten (Newell, 1982; Williams, pers. Mitt.). Da dies bisher zu keiner entscheidenden Verbesserung führte, kann der sexuelle Lebenszyklus noch nicht für die genetische Analyse verwendet werden. Bei der Keimung schwillt das Plasmodium und teilt sich mehrmals mitotisch, bis die Zellwand aufbricht und haploide Amöben freigesetzt werden, die die verschiedenen Lebenszyklen durchlaufen können (Wallace & Raper, 1979).

In D. discoideum sind bisher keine Mikrozysten gefunden

worden. Sie existieren jedoch in anderen Species, wie z.B. D.mucoroides (Olive, 1975). Es handelt sich dabei um Dauerstrukturen, in denen sich einzelne Amöben einzystieren (Olive, 1975).

3.4 Anzucht im Labor

D.discoideum hat viele Eigenschaften die es zu einem beliebten Untersuchungsobjekt machen. Die Anzucht im Labor ist relativ einfach. Die Amöben haben keine Zellwand, können in großem Volumen bakterienfrei bei Raumtemperatur angezogen werden und sind sehr resistent gegen Antibiotika, wie z.B. Streptomycin und Cycloheximid. Die Zellen sind insgesamt sehr robust und können große osmotische Unterschiede überstehen. Sporen von D.discoideum können ohne Schwierigkeiten trocken auf Silicagel (Reinhardt, 1966), und Amöben können in geeignetem Medium in flüssigem Stickstoff (Williams & Newell, 1976) konserviert werden, wodurch die genetische Analyse erleichtert wird.

D.discoideum kann in Verbindung mit Bakterien auf festem Medium oder in Schüttelkultur angezogen werden (s. 6.6). Normalerweise wird D.discoideum auf einem sehr reichen Medium (SM) (Sussman, 1966) angezogen, um eine möglichst hohe Zellausbeute zu erhalten. Manche Mutanten sind jedoch auf diesem Medium in ihrer Fruchtkörperbildung beeinträchtigt; deshalb empfiehlt es sich, sie auf SM, das nur 1/5 der Nährstoffkonzentration enthält, anzuziehen, wodurch ein dünnerer Bakterienrasen entsteht. Dies, sowie auch die Zugabe von 1% Aktivkohle, fördert aus unbekannten Gründen

die Fruchtkörperbildung (K. Williams, pers. Mitt.).

Weiterhin wird D. discoideum in Schüttelkultur mit Bakterien angezogen (Gerisch, 1961; Deering et al., 1970; Okamoto, 1981). Sobald keine Bakterien mehr vorhanden sind, beginnen sich die Zellen zu differenzieren, wobei sich kleine Zellaggregate mit prespore- und prestalk-Zellen bilden (Bonner, 1967); es kommt zur Ausbildung EDTA-sensitiver Kontaktstellen, die in der Aggregation eine wichtige Rolle spielen (Müller et al., 1979). Die Generationsdauer beträgt in Wildtypstämmen ungefähr 3 bis 4 Stunden (Raper, 1937). Einige Mutanten haben eine eingeschränkte Vitalität, und damit eine längere Generationsdauer, die jedoch im allgemeinen 6-7h nicht überschreitet.

Einige Stämme können auch bakterienfrei angezogen werden. Die Anzucht erfolgt in axenischem Medium (Watts & Ashworth, 1970; Cocucci & Sussman, 1970). Die ersten axenischen Stämme wurden in dem Labor von Sussman isoliert (Sussman & Sussman, 1967). Sie stammen von dem Wildtypstamm NC4 ab. Für axenisches Wachstum sind mehrere Gene notwendig (s. Appendix), welche wahrscheinlich Membranveränderungen bewirken, die die Art der Nährstoffaufnahme beeinflussen. Die Generationsdauer von AX2 (Watts & Ashworth, 1970) und AX3 (Loomis, 1971) in axenischer Kultur beträgt etwa 8-9h; die stationäre Phase ist in diesen Stämmen bei einer Dichte von ungefähr 1.5×10^7 Zellen/ml erreicht.

Durch die bakterienfreie Anzucht wurde das biochemische Arbeiten mit D. discoideum erleichtert; deshalb sind diese beiden axenischen Stämme für die meisten Untersuchungen

verwendet worden. Wie schon oben erwähnt, verursacht die Selektion von axenischen Mutanten den Verlust der endogenen Plasmide (s.4.4). Dies ist einer der Gründe, daß bisher keine endogenen Plasmide in D.discoideum gefunden wurden.

Axenische Stämme können auch in definiertem Medium angezogen werden (Franke & Kessin, 1977; Rahmsdorf, 1977). Damit wurde die Selektion auxotropher Mutanten möglich (Franke & Kessin, 1978; Podgorski, 1983). Es wurden mehrere Mutanten isoliert, die im Purin- und Pyrimidinstoffwechsel beeinträchtigt sind. Sie benötigen den Zusatz verschiedener Vorstufen in der Nukleotidbiosynthese (Franke & Kessin, 1978). Weiterhin wurden Mutanten isoliert, die in ihrer Thymidinsynthetase-Aktivität gestört sind. Eine dieser Mutanten wächst nicht in axenischem Medium, außer wenn höhere Mengen dTMP (Deoxythymidin-mono-phosphat) dem Medium zugesetzt werden (Podgorski, 1983). Auf die Bedeutung dieser Mutanten in der Konstruktion von Transformationsvektoren wird in der Diskussion ausführlicher eingegangen.

Bisher war es nicht möglich, Wildtyp-Stämme in axenischem Medium anzuziehen. Kürzlich wurde jedoch ein Kulturmedium veröffentlicht, das die Anzucht von NC4 in bakterienfreier Flüssigkultur ermöglicht (Maeda, 1983).

Auf festem Medium in Gegenwart von Bakterien ernähren sich Wildtypstämme fast ausschließlich durch Phagozytose und sind einkernig (Zada-Hames & Ashworth, 1977). Axenische Mutanten haben die zusätzliche Fähigkeit, sich pinocytotisch zu ernähren, wobei sie ihre phagocytotische Kapazität beibehalten. Die Unfähigkeit von NC4, axenisch zu wachsen,

beruht auf der geringen, pinozytotischen Aktivität (Turner et al., 1979; Vogel et al., 1980). Axenisch angezogene Zellen sind teilweise multinuklear und haben in Abhängigkeit von dem Grad der Multinuklearität ein entsprechend größeres Volumen; in einer axenischen Kultur sind etwa 30% der Zellen di-, tri- und tetranuklear (Zada-Hames & Ashworth, 1977), wogegen NC4 nach axenischer Passage uninuklear ist (Maeda, 1983).

3.5 Molekulargenetik

Das nukleare Genom von D.discoideum ist gut charakterisiert. Nukleare und mitochondrielle DNA können routinemäßig isoliert werden (Firtel & Bonner, 1972; Firtel, & Lodish, 1973; Fukuhara, 1982).

Das haploide Genom hat eine Komplexität von ungefähr 50×10^3 kbp und ist damit etwa zwölfmal so groß wie das E.coli-Genom. Jedoch hat D.discoideum - verglichen mit E.coli - etwa das 1000fache Zellvolumen. D.discoideum hat etwa 1/100 der Komplexität des menschlichen Genoms. Dies verdeutlicht den geringen DNA-Gehalt. Weiterhin ist der G+C-Gehalt von D.discoideum sehr gering: Das nukleare Genom hat etwa 22% G+C und Gesamt-polyA⁺-RNA ungefähr 30% G+C.

In einem Dichtegradienten "bandet" der Hauptteil der nuklearen DNA bei einer Dichte von 1.687 g/cm^3 und ein kleinerer Teil bei 1.676 g/cm^3 . Die mitochondrielle und ribosomale DNA besitzen beide eine Dichte von 1.682 g/cm^3 (Firtel & Bonner, 1972). Aufgrund von Sequenzanalysen kann man sagen, daß die Protein-codierenden Regionen ~30-40% G+C

haben. Nicht-codierende Regionen haben nur einen Gehalt von 5-20% G+C. Es gibt ungefähr 15000 Oligo-dT₂₅-Bereiche im D.discoideum-Genom.

Der Einzelkopien-Anteil der DNA in D.discoideum ist relativ hoch; er beträgt etwa 70-75% des Genoms; dies entspricht ungefähr dem 7fachen des E.coli-Genoms und 2% des menschlichen Genoms. Die restlichen 25-30% bestehen aus repetitiven Sequenzen, die etwa 100fach im haploiden Genom vorliegen. 40% der repetitiven Sequenzen bestehen aus ribosomaler DNA (rDNA). 40% des Einzelkopien-Anteils sind mit Abständen von ~1.2kbp, und 60% an repetitive Sequenzen mit Abständen von mehr als 5kbp gebunden. Die Abstände zwischen repetitiven und Einzelkopie-Elementen entsprechen dem Muster, das für Metazoen typisch ist (Firtel & Bonner, 1972; Kimmel & Firtel, 1982; Davidson et al., 1975).

In Pro- und Eukaryonten gibt es spezifische Methylierungsmuster (Razin & Riggs, 1980). In Metazoen besteht eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Genaktivität. Unter Verwendung isoschizomerer Restriktionsenzyme konnte bisher keine DNA-Methylierung in D.discoideum nachgewiesen werden (Kimmel & Firtel, 1982).

Die 5'-Enden der bisher charakterisierten Gene haben alle einen ähnlichen Aufbau: Der AT-Gehalt beträgt ~95%; die TATA-Box liegt etwa 25-40bp in Richtung des 5'-Endes von der Transkriptionsinitiationsstelle (AUG) entfernt. Die TATA-Sequenzen sind ähnlich, aber nicht identisch. Die kanonische Sequenz ist TATAAA^T_A und variiert bei allen bekannten Genen maximal um zwei Nukleotide. Die Sequenz scheint als

Erkennungsstelle für die RNA-Polymerase II und damit für die Transkriptionseffizienz wichtig zu sein: eine Punktmutation oder Deletion in der TATA-Box reduziert in vivo- und in vitro-Expression. Zwischen der TATA-Box und dem AUG-Signal liegt eine oligo-dT-Sequenz von variierender Länge und Homogenität. Die Oligo-dT-Sequenz ist - im Gegensatz zur TATA-Box - spezifisch für D.discoideum.

TATA-Box und oligo-dT-Sequenz sind zur Expression eines Genes notwendig, wie mit Actin-Pseudogenen gezeigt werden konnte, die entweder keine TATA-box oder keine Oligo-dT-Sequenz haben. Viele Gene sind während der Entwicklung unterschiedlich exprimiert. Die TATA-Box und die Oligo-dT-Sequenz scheinen keinen Einfluß auf die entwicklungsregulierte Genexpression auszuüben (McKeown & Firtel, 1981a, b). Bisher sind noch keine regulatorischen Sequenzen identifiziert worden (Kimmel & Firtel, 1982).

In D.discoideum gibt es - außer den in dieser Arbeit beschriebenen endogenen Plasmiden - zwei extrachromosomal vorliegende DNA-Species: das ribosomale Palindrom (s. Abb.4; Cockburn et al., 1978) und das mitochondrielle, circuläre Genom (s. Abb.5; Fukuhara, 1982).

Das rDNA-Palindrom

Die rRNA-Gene liegen extrachromosomal auf einem linearen Palindrom vor. Es handelt sich dabei um ein punktsymmetrisches Dimer, das dem Prinzip einer Haarnadel entspricht (s. Abb.4). Das Dimer hat eine Größe von ungefähr 90kb, und es liegen ungefähr 90 Kopien pro haploidem Genom vor. Die rDNA

stellt etwa 18% der nuklearen DNA dar und ergibt bei einem Restriktionsverdau von nuklearer DNA ein - für die verschiedenen Wildtypstämme - typisches Bandenmuster (z.B. 7 EcoRI-Banden in AX3; s. Abb.4 ; Cockburn et al., 1978; Welker et al., in Vorber.). Es gibt eine Reihe von C_nT -Wiederholungen an den Enden des Dimers, die wahrscheinlich für die Längenunterschiede des letzten EcoRI-Fragmentes verantwortlich sind (Emery & Weiner, 1981).

Bisher konnte keine integrierte Kopie im Genom nachgewiesen werden (Cockburn et al., 1978). Diese Ergebnisse wurden von Welker et al., (in Vorber.) bestätigt.

Die cytoplasmatische rRNA besteht aus den 26S-, 17S-, 5.8S- und 5S-Untereinheiten. Die rRNA bildet mit 90% den Hauptteil der Zell-RNA. Eine der beiden , auf dem ribosomalen Palindrom liegenden, Transkriptionseinheiten codiert die 36S rRNA-Vorstufe, die nach RNA-Reifung die 26S-, 17S- und 5.8S-Untereinheiten ergibt. Die 5S-rRNA-Untereinheit liegt getrennt davon auf der zweiten Transkriptionseinheit (s. Abb.4). Die codierenden Regionen haben einen GC-Gehalt von etwa 50-60%. Die dazwischen liegenden Bereiche, die etwa 80 % der rDNA ausmachen, haben nur 22-28% G+C. Die Sequenz der 5S RNA weist eine hohe Homologie zu der entsprechenden Säugetier- (62%) und Hefe-RNA (56%) auf (Hori et al., 1980). In Tetrahymena thermophila (Engberg et al., 1976; Karrer & Gall, 1976; Cech & Brehm, 1981) und Physarum polycephalum (Vogt & Braun, 1976; Vogt & Braun, 1977) liegt die rDNA ebenfalls als extrachromosomales Palindrom vor, wobei in der

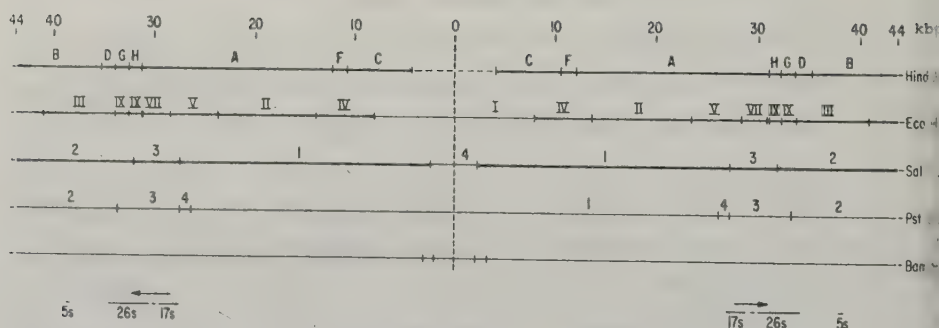


Abb.4. Das extrachromosomale rDNA-Palindrom (aus Cockburn et al., 1978). Die Länge ist in kbp angegeben. Die EcoRI-Fragmente sind mit römischen Zahlen, die HindIII-Fragmente mit Buchstaben gezeichnet, wogegen die SalI- und PstI-Fragmente mit arabischen Zahlen numeriert sind.

Die codierende Regionen der beiden rRNA-Transkriptionseinheiten sind mit einem Strich gekennzeichnet, wobei die Pfeile die Transkriptionsrichtung der 36S-rRNA-Vorstufe angeben.

Mitte des Moleküls der Replikationsursprung liegt. Im Mikronukleus von T.thermophila konnte eine ins Genom integrierte Kopie nachgewiesen werden (Yao & Gall, 1977), wogegen es in P.polycephalum wahrscheinlich keine ins Genom integrierte Kopie gibt (Ferris et al., 1983). Jedoch ist in beiden Organismen die 5S-rRNA nicht auf dem Palindrom lokalisiert, sondern tandemartig aufgereiht in der chromosomalen DNA (Kimmel & Firtel, 1982). Die Struktur der Termini der rDNA von D.discoideum ist unbekannt (Emery & Weiner, 1981). Die Termini der rDNA von T.thermophila sind gut charakterisiert (Blackburn & Gall, 1978) und konnten anstelle von Telomeren in der Konstruktion linearer Minichromosomen in S.cerevisiae verwendet werden (Struhl, 1983).

tRNA

Im D.discoideum-Genom sind etwa 1000 tRNA-Gene zu finden. Ihre Anordnung ist bisher noch nicht völlig geklärt. Sie sind in einem Bereich von ungefähr 10kbp nicht-colinear angeordnet. Bisher gibt es keine Hinweise für eine entwicklungsregulierte Transkription (Kimmel & Firtel, 1982; Peffley & Sogin, 1981).

mtDNA

Das mitochondrielle Genom (mt-Genom) hat einen Umfang von ~54kb und liegt in circularer Form vor (s. Abb.5). Es hat

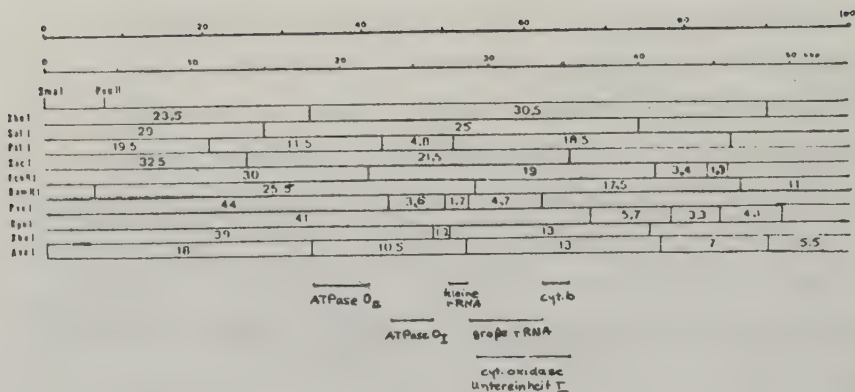


Abb.5. Restriktionskarte des circularen mt-Genoms (aus Fukuhara, 1982). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde es in der Restriktionskarte an der einzigen SmaI-Schnittstelle linearisiert. Die verschiedenen codierenden Regionen sind mit schwarzen Strichen eingetragen.

einen G+C-Gehalt von ~28%, der relativ homogen über das mt-Genom verteilt ist (Firtel & Bonner, 1972; Cockburn et al., 1978). Der Gehalt an mtDNA beträgt - in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen und dem Zellzyklus - etwa die Hälfte der Gesamt-DNA (Sussman & Rayner, 1971; Weijer et al., im Druck). Da das chromosomale Genom von D.discoideum - verglichen mit anderen eukaryontischen Zellen klein ist, sind die rDNA und die mtDNA mengenmäßig relativ überrepräsentiert.

Die mtDNA codiert für verschiedene Enzyme der Atmungskette, wie z.B. Untereinheiten der ATPase und der Cytochrom-Oxidase. Unter Verwendung von S.cerevisiae-Hybridklonen konnte gezeigt werden, daß alle Proben mit D.discoideum-mtDNA hybridisieren; damit besteht eine große Homologie zu den entsprechenden Hefegenen; jedoch sind die dazwischen liegenden nicht codierenden Regionen sehr divergent; so besteht nur etwa 15% Homologie zwischen den Gesamt-mtDNAs von D.discoideum und S.cerevisiae (Fukuhara, 1982). Ähnliches wurde auch in verschiedenen Hefe-Gattungen beobachtet; durch die Variation der Größe (zwischen 28 und 100kbp) bei verschiedenen Hefen (McArthur & Clark-Walker, 1983), läßt sich die Dynamik des mt-Genoms verdeutlichen.

Transkription

Hier wird nur kurz auf die Transkription eingegangen. Eine gute Zusammenfassung ist in Kimmel & Firtel (1982) zu finden. Die meisten RNAs von D.discoideum enthalten eine PolyA-Sequenz. Es gibt eine etwa 25 Nukleotide lange

PolyA-Sequenz, die von der DNA transkribiert wird. Eine zweite Klasse besteht aus einer posttranskriptionell angehängten PolyA-Sequenz mit etwa 125 Nukleotiden. Die Länge dieser PolyA-Sequenz nimmt mit dem Alter der RNA ab und erreicht ein steady state bei etwa 60 Nukleotiden. Beide PolyA-Sequenzen können in einem Transkript vorhanden sein und sind nur wenige Nukleotide voneinander entfernt. Sie werden am 3'-Terminus verknüpft und bei der mRNA-Reifung beibehalten. Es gibt jedoch auch mRNAs, die nur über eine der beiden Sequenzen verfügen (Jacobson et al., 1974; Palatnik et al., 1979).

Nukleare PolyA⁺-RNA (hn-RNA) ist um etwa 25% größer als cytoplasmatische RNA. Die Introns bestehen oft nur aus ~100 Nukleotiden und sind sehr AT-reich (Kimmel & Firtel, 1982). Eine spezifische mRNA ohne PolyA codiert die Histonproteine. Dies ist auch aus anderen Systemen bekannt. Weiterhin gibt es in D.discoideum Proteine, die von mRNAs der PolyA⁻-Fraktion, aber auch von der PolyA⁺-Fraktion codiert werden (Kimmel & Firtel, 1982).

Die 5'-Enden der hnRNA und mRNA werden nach der Transkription durch eine "cap"-Struktur modifiziert (Dottin et al., 1976).

Durch den einfachen Lebenszyklus von D.discoideum ist es möglich, spezifische Muster der Genexpression, z.B. in den prespore- und den prestalk-Zellen, sowie den Sporen und Stielzellen selbst, zu untersuchen (Williams & Lloyd, 1979; Röwekamp & Firtel, 1980; Röwekamp et al., 1980; Jacquet et al., 1981; Mehdy et al., 1983; Alexander et al., 1983).

Sobald die Zellen in das Stadium der Präaggregation übergehen, und cAMP-sensitiv werden, wird die Genaktivität stark verändert, wie über sequentielle Veränderungen auf der Ebene der Transkription und Translation nachgewiesen werden konnte (Gerisch et al., 1975; Kimmel & Firtel, 1982). cAMP reguliert die Genaktivität in voraggregierenden Zellen, aber auch in Zellen während der späten Entwicklungsphase (Kimmel & Firtel, 1982; Mehdy et al., 1983).

Verschiedene entwicklungsabhängige Enzymaktivitäten und Proteine, wie z.B. die Glykogenphosphorylase, Discoidin I und II, und das contact site A-Protein, werden während der Entwicklung induziert und erreichen schnell ihr Maximum. Die Veränderungen sind meistens mit einer de novo mRNA- und Proteinsynthese verbunden und finden zu einem großen Teil in präaggregierenden Zellen statt. Sobald der Zellkontakt etabliert ist, können etwa 40 neu synthetisierte Proteine über zweidimensionale Elektrophorese nachgewiesen werden (Kimmel & Firtel, 1982). Aus cDNA-Klonbanken, die zu mRNAs verschiedener Entwicklungsstadien hergestellt wurde, konnten entwicklungsregulierte und konstitutive Gene isoliert werden (Röwekamp & Firtel 1980; Röwekamp et al., 1980; Kimmel & Firtel, 1982; Chung et al., 1983; Mehdy et al., 1983).

Kombination der klassischen mit der molekularen Genetik

Nachdem verschiedene Gene kloniert vorliegen und gut charakterisiert sind, ist es möglich, die klassische (parasexuelle) Genetik mit der Molekulargenetik zu kombinieren. Zum Beispiel kann die Divergenz von Genen in

verschiedenen Wildtypstämmen anhand von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) untersucht werden. Dies wurde z.B. mit der rDNA, Actin und tRNA durchgeführt (Welker et al., in Vorber.). Es zeigte sich, daß die einzelnen Wildtypstämme teilweise einen ausgeprägten Polymorphismus besitzen. Es ist wahrscheinlich, daß ein Großteil der Veränderungen im nicht-Protein-codierenden Bereichen liegen (Welker et al., in Vorber.). Ähnliches konnte mit der rDNA von P.polycephalum gezeigt werden (Ferris et al., 1983). Falls ein Gen auf einem Chromosomenbereich liegt, der in einer Mutante dupliziert vorliegt (Williams et al., 1980; Welker et al., 1982), kann Genkartierung durch Intensitätsveränderungen in einem genomischen Southern blot erfolgen: auf diese Weise konnten zwei Actingene kartiert werden (Welker et al., in Vorber.).

Transponierbare Elemente

Kürzlich konnten transponierbare Elemente in D.discoideum nachgewiesen werden. Sie sind mit entwicklungsregulierten Genen (Chung et al., 1983; Poole et al., in Druck; Rosen et al., 1983), bzw. mit einem durch Hitzeschock induzierbaren Transkript assoziiert (Rosen et al., 1983).

Transformation

Durch die Isolierung und Charakterisierung von rekombinanten DNA-Klonen mit entwicklungsregulierten Genen konnten die Genstruktur aufgeklärt und Veränderungen in der mRNA-Synthese in D.discoideum nachgewiesen werden. Für eine

spezifischere Analyse ist es notwendig, entwicklungsregulierte Gene wieder in D.discoideum einführen zu können, um z.B. den Einfluß von Mutationen innerhalb eines Genes auf die Expression zu untersuchen. Dazu muß ein reproduzierbares Transformationssystem, wie es z.B. für S.cerevisiae besteht (Hinnen et al., 1978), aufgebaut werden; dies ermöglichte in S.cerevisiae unter anderem, die Prinzipien der Genregulation im Detail zu untersuchen (Struhl, 1983).

In der Literatur sind bereits verschiedene Transformationsprotokolle für D.discoideum beschrieben worden (Ratner et al., 1981; Hirth et al., 1982; Barclay & Meller, 1983); jedoch können sie bisher nicht routinemäßig angewendet werden. Da bis jetzt keine endogenen Plasmide in D.discoideum bekannt waren, wurden Transformationsvektoren mit E.coli, Virus- oder Hefe-Sequenzen konstruiert; diese werden in D.discoideum, bedingt durch den hohen AT-Gehalt, oft umgeordnet (Firtel, pers. Mitt.); weiterhin gibt es Probleme mit dem selektiven Marker (G418-Resistenz) und der Selbstreplikation des Transformationsvektors. Aus diesen Gründen erscheint es vorteilhaft, das endogene D.discoideum-Plasmid Ddp1, welches mit einer instabilen Cobaltresistenz assoziiert ist, zu verwenden. Ddp1 und auch die anderen endogenen Plasmide bieten wahrscheinlich viele Vorteile für die Konstruktion eines geeigneten Transformationsvektors.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden die Entdeckung und Charakterisierung des endogenen Plasmids Ddp1, welches mit der instabilen Cobaltresistenz (cob-354) in Stamm HU32 assoziiert ist, beschrieben. Es wurden der Ursprung und Mechanismen dieser Cobaltresistenz (cob-354) im Zusammenhang mit Ddp1 untersucht. Weiterhin wurden die Plasmide Ddp2 aus NC4 bzw. Ddp3 aus V12 isoliert, die Ddp1 sehr ähnlich sind.

4.1 Cobaltresistenz

4.1.1 Cobaltresistenz in Klebsiella aerogenes

Da die Selektion von Diploiden nach parasexuellen Kreuzungen u.a. über Cobaltresistenz durchgeführt wird, erfolgt die Anzucht von D.discoideum routinemäßig in Gegenwart einer cobaltresistenten Mutante des K.aerogenes-Stammes 1033 (Ushiba & Magasanik, 1952), die durch Ausplattieren auf Cobalt-SM leicht isoliert werden kann. Aus diesem Grund war ein Zusammenhang zwischen der Cobaltresistenz in K.aerogenes und D.discoideum nicht auszuschließen.

4.1.2 Instabile Cobaltresistenz in Dictyostelium discoideum Stamm HU32

Es ist ein chromosomaler Cobaltresistenz-Locus in D.discoideum, der cobA-Locus auf Kopplungsgruppe VII bekannt. Diese chromosomale Mutation ist stabil (s. Diskussion). Hier wurde die ungewöhnliche, instabile Cobaltresistenz (cob-354) des

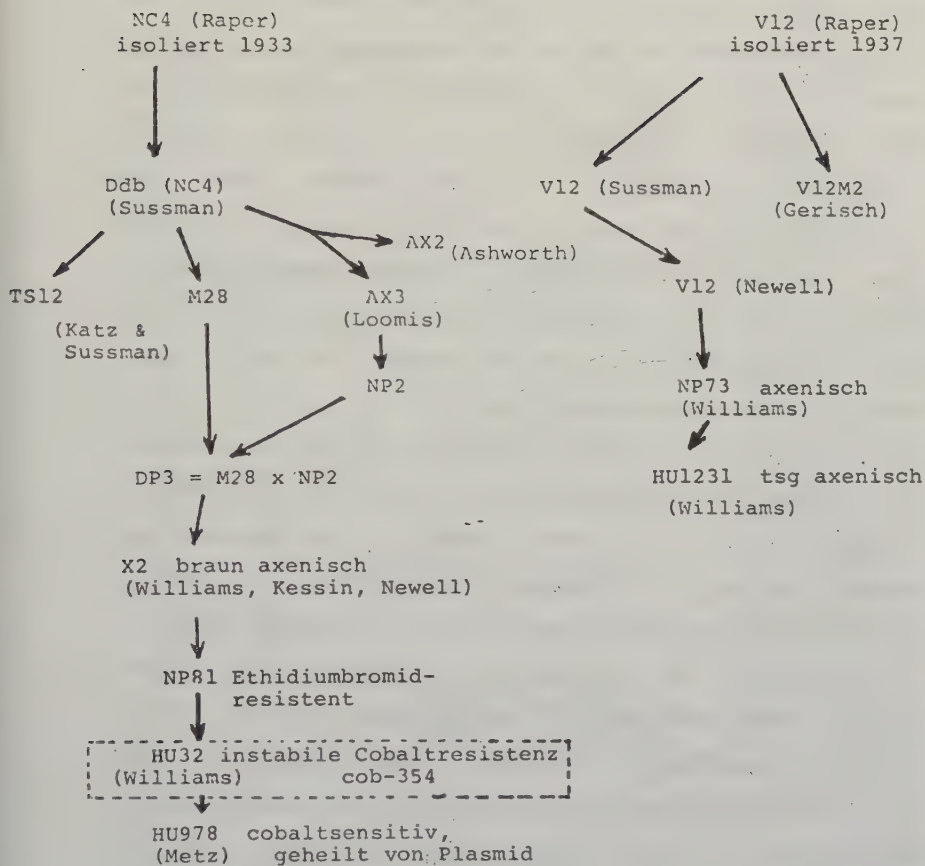


Abb.6. Herkunft des Stammes HU32 mit der cob-354-Mutation und der Standardlaborstämme (von NC4 abstammend; s. linke Seite der Abbildung) Im rechten Teil sind die von dem Wildtypstamm V12 abstammenden Stämme aufgeführt, die axenisch wachsen können. Nähere Erläuterungen s.u. Die Genotypen sind im Appendix aufgelistet.

Stammes HU32 untersucht, bei dem es sich um eine spontane cobaltresistente Mutante von Stamm NP81 handelt (Williams, 1978). NP81 stammt von X2 ab; NP81 unterscheidet sich von X2 durch eine zusätzliche Ethidiumbromidresistenz-Mutation auf Kopplungsgruppe IV (Wright et al., 1977). Im Laufe der Untersuchungen wurde X2 als "Elternstamm" von HU32 verwendet, da X2 sich leicht von dem von der instabilen Cobaltresistenz geheilten HU32, d.h. HU978 unterscheidet, da HU32 und HU978 die Ethidiumbromidresistenz von NP81 besitzen. Abb.6 veranschaulicht die Herkunft von HU32, sowie anderer Standardlaborstämme.

Aus Gründen der einfacheren Ausdrucksweise soll der Begriff der "Anzucht von D.discoideum auf festem Medium" definiert werden: es handelt sich dabei immer um die Anzucht auf Standardmedium (SM) in Gegenwart von Bakterien (ein cobaltresistenter K.aerogenes-Stamm; Ushiba & Magasanik, 1952).

Der Stamm HU32 hat mit der cob-354-Mutation die bisher höchste Cobaltresistenz in D.discoideum. Sie ist völlig dominant gegenüber dem Wildtyp; HU32 wächst mit hoher Plattierungseffizienz auf festem Medium unter Zusatz von bis zu $500\mu\text{g/ml CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Die Resistenz geht jedoch nach etwa 50 Generationen auf SM unter nicht-selektiven Bedingungen völlig verloren (Williams, 1978).

Die Versuche die cob-354-Mutation einer der Kopplungsgruppen zu zuordnen, sind in Tab.I zusammengefaßt.

HU32 wurde mit HU892 gekreuzt, und die daraus resultierende

Tab.1A. Schema der Haploidisierung anhand des Beispiels der Diploiden DU1569 = HU32 x HU892

Diploide	Eltern- stämme	Kopplungsgruppe					
		I	II	III	IV	VI	VII
DU1569	HU32	+	axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1 tsgA1	bwnA1 ebrA1	+	+
		-----	-----	-----	-----	xxxxx	-----
		xxxxx	xxxxx	xxxxx	xxxxx	-----	xxxxx
	HU892	cycA1	acrA1 tsgD12 whiA1	bsgA1	bwnA1	+	couA351 tsgK21 frtB353

Diese Tabelle veranschaulicht wie in *D.discoideum* mit Methoden der parasexuellen Genetik Chromosomen ausgetauscht werden. Es wird der Genotyp der Diploiden DU1569 gezeigt, die durch parasexuelle Fusion aus den beiden Haploiden HU32 und HU892 entstanden ist. Bei der Haploidisierung dieser Diploiden geht willkürlich über instabile Aneuploidie eines der beiden homologen Chromosomen verloren. Die Kopplungsgruppen, die in der Segregante HU1159 (vgl. Tab.1B) erhalten bleiben, sind mit xxxxx gekennzeichnet, wogegen diejenigen, die verloren gehen, mit ----- markiert sind. Mit + ist das Wildtypallel gekennzeichnet.

Die Segregante HU1159 zeichnet sich durch einen Austausch von allen markierten Kopplungsgruppen mit Ausnahme von Kopplungsgruppe VI aus.

In Tab.1B sind die weiterführenden Kreuzungen und Segregationen zusammengefaßt.

Tab.1B. Austausch der Kopplungsgruppen von HU32 unter Beibehaltung der instabilen Cobaltresistenz (cob-354)

Haploider Stamm	Eltern- Stämme	ausgetauschte Chromosomen	Kopplungsgruppe					
			I	II	III	IV	VI	VII
HU32	NP31	+		axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1 tsgA1	bwnA1 ebrA1	+	+
HU1159	DU1569 (HU32/ HU892)	I, II, III IV, VII	cycA1	acrA1 tsgD12 whiA1	bsgA5	bwnA1	+	couA351 tsgK21 frtB353
HU1134	DU1713 (HU1159/ AX3)	I, II	+	axeA1 axeC1 oaaA1	bsgA5	bwnA1	+	couA351 tsgK21 frtB353
HU1315	DU1865 (HU1184/ HU485)	III, IV	+	axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1	whiC351	+	couA351 tsgK21 frtB353
HU1491	DU2143 (HU1315/ HU526)	I, III VI, VII	cycA1	axeA1 axeC1 oaaA1	bsgA5	whiC351	manA2	+

Diploide DU1569 wieder haploidisiert. (Zur Beibehaltung der cob-354-Mutation muß die Anzucht der Diploiden und Haploiden unter selektiven Bedingungen durchgeführt werden!). In der Segregante HU1159 sind die Kopplungsgruppen I, II, III, IV und VII ausgetauscht (s. Tab.1A). Besonders wichtig ist der Austausch der Kopplungsgruppe VII, da sich dort der cobA-Locus befindet (Welker & Williams, 1980a). HU1159 wurde mit anderen Markerstämmen gekreuzt, bis alle Kopplungsgruppen ausgetauscht waren (s. Tab.1B). Einige wurden dabei mehrmals ausgetauscht. Lediglich bei der nicht markierten Kopplungsgruppe V kann der Austausch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Da diese Kopplungsgruppe jedoch wahrscheinlich durch Translokation mit einer anderen Kopplungsgruppe segregiert, ist auch sie mit höchster Wahrscheinlichkeit ausgetauscht worden. Die cob-354-Mutation blieb bei dem Austausch der Chromosomen erhalten; sie läßt sich also nicht chromosomal lokalisieren.

Es wurde im Zusammenhang mit der Coumarinsensitivitätsmutation (couA351) auf Kopplungsgruppe VII (s. Tab.I) eine zusätzlich Beobachtung gemacht: Stämme, die über die instabile Cobaltresistenz und gleichzeitig eine Coumarin-Sensitivitäts-Mutation verfügen (z.B. HU1184 und HU1315 (Genotypen Tab.1B), exprimieren nicht den Phänotyp der Coumarinsensitivitäts-Mutation; so hat HU1315 eine Plattierungseffizienz von 40% auf Coumarin-SM (1,3mM Coumarin); dies entspricht dem couA351-Wildtyp. HU1315 wurde durch mehrere Passagen auf SM von der instabilen Cobaltresistenz - und auch von Ddp1 (nachgewiesen über Plasmidpräparationen,

s.u.) - geheilt, ; der geheilte Stamm erhielt den Namen HU1655 und exprimiert den Coumarinsensitivitäts-Phänotyp, wie sich über eine Plattierungseffizienz von 1.6% auf Coumarin-SM nachweisen ließ.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß der Phänotyp der instabilen Cobaltresistenz mit der Suppression der Coumarinsensitivitäts-Mutation (couA351) assoziiert ist.

4.1.3 Axenisches Wachstum von Dictyostelium discoideum. insbesondere Stamm HU32. in Gegenwart von CoCl_2

In Kontrollexperimenten konnte ein Plasmid in K.aerogenes nachgewiesen werden. Um Komplikationen zu vermeiden, wurde versucht D.discoideum Stamm HU32 in bakterienfreier Flüssigkultur anzuziehen. Vom Genotyp hat HU32 die Befähigung zu axenischem Wachstum. So mußte zuerst die Konzentration $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ gefunden werden, die axenisches Wachstum von HU32 unter Beibehaltung der instabilen Cobaltresistenz ermöglicht. Es erschien wahrscheinlich, daß die für einen cobaltsensitiven Stamm toxische Cobaltkonzentration, sowie auch die für die Beibehaltung der instabilen Cobaltresistenz in HU32 erforderliche Konzentration, verglichen mit der Anzucht auf festem Medium, geringer ist.

Axenische Kulturen wurden mit Amöben HU32 und dem cobaltsensitiven Elternstamm X2 bei einer Zelldichte von mehr als 10^5 Zellen/ml und verschiedenen CoCl_2 -Konzentrationen angeimpft.

X2 hatte ohne Zusatz von CoCl_2 eine Generationsdauer von ~12h und die stationäre Phase lag bei einer Zelldichte von

$\sim 1.5 \times 10^7$ Zellen/ml. Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g}$ blieb die Zellzahl zunächst über mehrere Tage unverändert, wobei jedoch die Größe der Zellen zunahm. Die Zellen blieben in Gegenwart von $100 \mu\text{g/ml}$ CoCl_2 lebensfähig und teilten sich schließlich. Die Generationsdauer lag bei 24-36 Stunden und die stationäre Phase bei $\sim 3-5 \times 10^6$ Zellen/ml. Um zu klären, ob es sich dabei um eine spontane Cobaltresistenz-Mutation in X2 handelte, wurden Zellen auf SM und Cobalt-SM ausplattiert. Die Zellen hatten eine hohe Plattierungseffizienz auf SM und waren cobaltsensitiv, verfügten also nicht über eine Cobaltresistenz-Mutation. Bei höheren Konzentrationen konnten keine bakterienfreien Kulturen von X2 etabliert werden.

In den axenischen Kulturen von HU32 trat in Gegenwart von CoCl_2 zunächst eine lag-Phase auf, in der sich die Zellen vergrößerten. Nach mehreren Tagen teilten sich die Zellen und wuchsen in Gegenwart von $150 \mu\text{g/ml}$ CoCl_2 mit einer Generationsdauer von ~ 36 Stunden bis auf eine Zelldichte von maximal 5×10^6 Zellen/ml. Es dauerte etwa einen Monat eine axenische Kultur von HU32 zu etablieren.

Bei den höheren Konzentrationen war das Wachstum länger verzögert. Die Zellen teilten sich in einem Zeitraum von mehr als 40 Stunden und wuchsen anfänglich maximal auf eine Dichte von etwa 10^6 Zellen/ml.

Der Bereich, in dem HU32 die instabile Cobaltresistenz - ohne erhebliche Beeinträchtigung der Generationsdauer - behält, wurde genauer bestimmt (s Tab.II). Dazu wurden ausgehend von einer etablierten Kultur von HU32 + $150 \mu\text{g/ml}$

CoCl_2 axenische Kulturen bei verschiedenen Konzentrationen CoCl_2 angeimpft, und über einen längeren Zeitraum bei der jeweiligen Konzentration CoCl_2 weitergeführt. Beim Überimpfen in frisches Medium (nach ~5 Generationen) wurde der Grad der Cobaltresistenz auf Platten überprüft (s. 6.6.5). Die Wachstumsrate war bei den verschiedenen CoCl_2 -Konzentrationen fast gleich; die Kultur ohne CoCl_2 wuchs geringfügig schneller.

Tab.II. Verhalten der instabilen Cobaltresistenz von HU32 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen CoCl_2 .

Generationen	Plattierungseffizienz auf Cobalt-SM (%), bezogen auf jeweils ~100% auf SM			
	0	50 $\mu\text{g/mlCoCl}_2$	100	150
0				60
10	8	18	22	50
25	3	10	20	41
40	0.05	8	14	60
55	0.01	5	10	50

Verglichen mit der Kultur ohne CoCl_2 wurde in Gegenwart von $50\mu\text{g/ml}$ und $100\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 der Verlust der instabilen Cobaltresistenzen verzögert, wogegen HU32 in Gegenwart von $150\mu\text{g/ml}$ die für HU32 auf Cobalt-SM typische Plattierungseffizienz von ~60% aufweist.

In Abb.7 ist der Verlust der instabilen Cobaltresistenz von HU32 in axenischer Kultur unter nicht selektiven Bedingungen graphisch dargestellt. Die Zahl der Generationen, die zum Heilen notwendig ist, lag in diesem Experiment (vgl. Tab. II) ebenfalls bei etwa 50 Generationen.

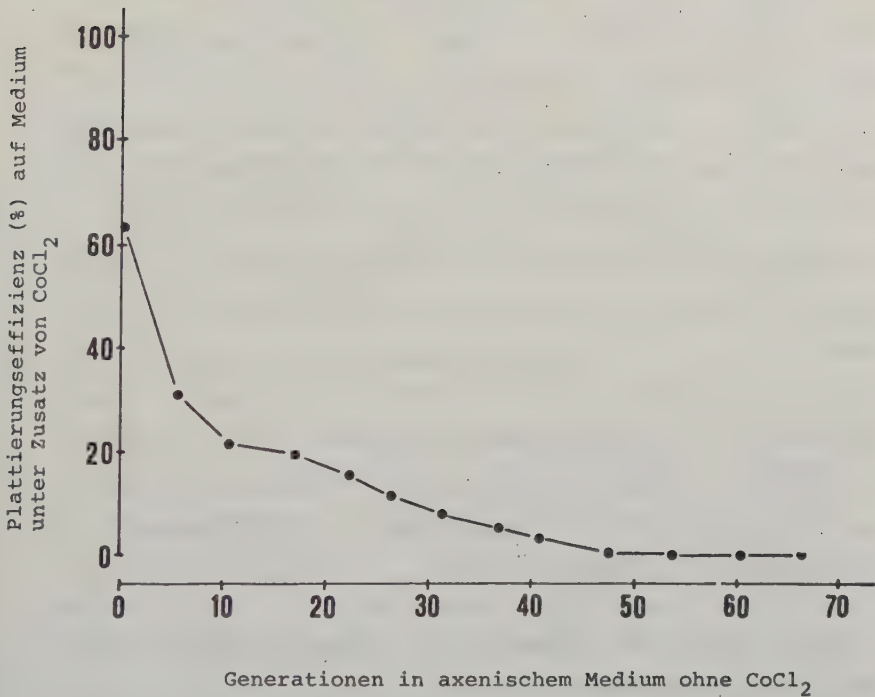


Abb.7. Verlust der Cobaltresistenz von HU32 in bakterienfreier Flüssigkultur; ausgehend von einer axenischen Kultur mit $150\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 wurden die Zellen ohne Zusatz von CoCl_2 axenisch angezogen und nach jeweils 5 Generationen in frisches Medium überimpft, wobei gleichzeitig die Cobaltresistenz überprüft wurde (s. 6.6.5). Die hier gezeigte Plattierungseffizienz bezieht sich auf die Cobalt-SM-Platten, korreliert mit der Plattierungseffizienz auf SM, die bei ~100% lag.

Das Heilen in bakterienfreier Flüssigkultur wurde mit dem auf festem Medium verglichen (s. Williams, 1978). Nach 40 bis 50 Generationen in bakterienfreier Flüssigkultur ist HU32 - in Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf festem Medium - cobaltsensitiv geworden.

Einer der von der instabilen cob-354-Resistenz axenisch geheilten Stämme ist z.B. HU978. Die Cobaltsensitivität dieses Stammes ist mit der des cobaltsensitiven Elternstammes vergleichbar: cobaltresistente Kolonien treten mit der normalen Frequenz einer chromosomalen Mutation auf und sind stabil.

Sobald eine axenische Kultur von HU32 etabliert war, wurde routinemäßig die cob-354-Mutation überprüft. HU32 konnte monatelang problemlos in bakterienfreier Flüssigkultur unter Zusatz von CoCl_2 angezogen werden, ohne daß auf chromosomale Cobaltresistenz selektioniert wurde.

4.2 Entwicklung der Methode zur Plasmidisolierung in Dictyostelium discoideum Stamm HU32

Prinzipien der Plasmidisolierung

Da die instabile Cobaltresistenz in HU32 Ähnlichkeiten zu bakteriellen Plasmiden hat, wurde in diesem Stamm, und damit erstmals in D. discoideum, nach einem Plasmid gesucht. Die meisten Methoden zur Plasmidisolierung sind für Bakterien entwickelt worden sind (Tab.III). So mußte zunächst eine Methode gefunden, bzw. modifiziert werden, die zum eventuellen Nachweis eines Plasmids in D. discoideum geeignet war. In Tab.III sind die Prinzipien der verschiedenen ge-

prüften Methoden zusammengestellt.

Im allgemeinen wird eine Kombination folgender Prinzipien verwendet (s.Tab.III): Alkalische Denaturierung linearer DNA und hochmolekularer Verbindungen (s.u.); Abtrennung der linearen DNA durch Hochsalzfällung und/oder selektive Phenolextraktion; Hydroxyapatit-Chromatographie (Colman et al., 1978); Konzentration über Polyethylenglykol- und Ethanol-fällung; Nachweis über Agarosegelelektrophorese; Dichtegradientenzentrifugation.

4.2.1 Probleme bei der Plasmidisolierung

Bei der Plasmidisolierung aus D.discoideum sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen: a) das ungünstige Verhältnis von Zellvolumen/DNA und b) die phagozytotische Lebensweise, wodurch der hohe Gehalt an lytischen Enzymen, u.a. Nukleasen bedingt ist. Von den oben erwähnten Methoden erschienen zwei für D.discoideum vielversprechend, da sie zur Isolierung viraler cc-DNA aus Gewebekulturzellen entwickelt worden sind (Hirt, 1967; McMaster et al., 1980). Sie wurden ebenso wie die anderen Methoden an D.discoideum adaptiert und unter Variation von z.B. Puffermengen und Detergentien geprüft (s.Tab.II). In den ersten Versuchen gab keine dieser Methoden einen Hinweis auf Plasmid-DNA.

Tab.III. Methoden der Plasmidisolierung

A Plasmidisolierungsmethoden

Methode	Organismus	Detergens	D.discoideum-Modifikation: $\pm$ in Analogie zu der ursprünglichen Methode durchgeführt
Hirt, 1967	Virus-DNA aus Gewebekulturzellen	SDS	Lyse 10min bei RT, Hochsalzfällung, Dichtegradientenzentrifugation mit Überstand
Clewell & Helinski 1969	Bakterien	SDS/ Brij 58	völlig lysierte D.discoideum-Zellen, Pronase-Verdau, Dichtegradientenzentrifugation
Currier & Nester, 1976	große Plasmide aus Bakterien	SDS	Lyse, Pronase-Verdau, Hochsalzfällung, selektive Phenolextraktion einzelsträngiger DNA, ETOH-Fällung
Casse et al., 1979	große Plasmide aus Bakterien	SDS	Lyse bei RT, selektive alk. Denaturierung, Hochsalzfällung, mit Überstand selektive Phenolextraktion, einzelsträngiger DNA
Birnboim & Doly, 1979	Bakterien	SDS	Lyse bei 4°C, selektive alk. Denaturierung, Hochsalzfällung, ETOH-Fällung des Überstandes
McMaster et al., 1980	Bakterien; Virus-DNA aus Gewebekulturzellen	TNS	Lyse bei 4°C, selektive alk. Denaturierung, Hochsalzfällung mit dem Überstand selektive Phenolextraktion einzelsträngiger DNA, PEG-Fällung
Holmes & Quigley, 1981	Bakterien	Triton X-100	Lyse bei 4°C, incub. 40sek bei 100°C, oder 5min bei 60°C, Isopropanol-Fällung des Überstandes

TNS : Isopropyl-naphthalen-Sulfonsäure
PEG : Polyethylenglykol (MW : 6000)

B Plasmidreinigungsmethoden

Ausgangsmaterial	Methode
Zaslloff et al., 1978	RNase-behandelte, Phenol-extrahierte Plasmid-DNA, isoliert nach der Modifikation von Birnboim & Doly, 1979 selektive saure Phenolextraktion zur Beseitigung von DNA-Spezies, die nicht in der cc-Form vorliegen; bisher jedoch immer Probleme mit dem Schneiden der DNA
Hoopes & McClure,	Plasmid-DNA isoliert nach der Modifikation von DNA mit Spermin

Die Gründe dafür waren wohl durch den Organismus selbst bedingt. So wurden einzelne Schritte der in Tab.III aufgelisteten Methoden bei Raumtemperatur durchgeführt, bzw. wurde öfters ein Pronase-Verdau bei 37°C vorgeschaltet; beides führt in D.discoideum zur Degradation der DNA. Es empfiehlt sich, zur Inaktivierung von Nukleasen, Diethylpyrocarbonat vor der Zellyse zuzugeben (J. Williams, pers. Mitteilung) und alle Schritte auf Eis durchzuführen. Unter Berücksichtigung dieser Vorsichtsmaßnahmen konnte schließlich mit einer Modifikation der Methode von Birnboim und Doly, (1979) Plasmid-DNA aus D.discoideum isoliert werden (s. auch 6.7.1). Diese Methode beruht auf der irreversiblen, selektiven, alkalischen Denaturierung und Fällung von linearer DNA und anderen hochmolekularen Verbindungen, wogegen Plasmid-DNA im Überstand bleibt. In Vorversuchen wurden die Volumenverhältnisse von Zellsuspension zu alkalischer SDS-Lösung ermittelt, die reproduzierbar den erforderlichen pH von 12.0 bis 12.4 ergeben. Weiterhin mußte die Zelldichte bestimmt werden, die eine gute Zellyse und eine effiziente Fällung der hochmolekularen Verbindungen in D.discoideum ermöglicht. Abb.8 zeigt das Plasmid Ddp1, das aus dem Stamm HU32 (aus axenisch angezogenen Zellen) isoliert worden ist, nach einer Modifikation der von Birnboim & Doly, 1979 beschriebenen Methode.

4.2.2 Reinigung der Plasmid-DNA

Der DNA-Gehalt und die Ausbeute an Plasmid, sowie die Qualität der Plasmidpräparation läßt sich in D.discoideum

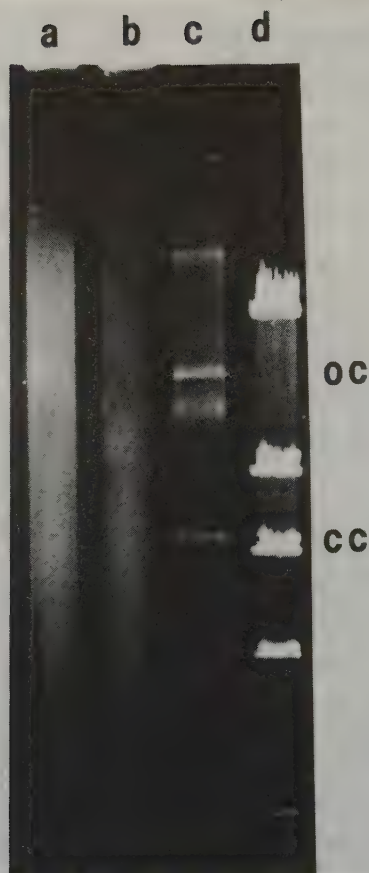


Abb.8. a-c Plasmidpräparationen aus axenisch angezogenem HU32;

a+b die "boiling method" (Holmes & Quigley, 1981), die in Bakterien saubere Plasmidisolierung ermöglicht (s.6.12.3), wurde geprüft. Es scheint jedoch ein Mureinskelett notwendig zu sein, da in D. discoideum mit dieser Methode die DNA degradiert. Die Zellen wurden a) 5min bei 70°C; b) 40sec bei 100°C inkubiert;

c) nach Birnboim & Doly, 1979: das Plasmid Ddp1 ist in der oc- und cc-Form eindeutig nachweisbar. Bei der hochmolekularen Bande handelt es sich um restliche chromosomale DNA; die diffuse Bande unterhalb der oc-Bande enthält linearisiertes Ddp1. In den Spuren a-c wurde das Äquivalent zu $\sim 5 \times 10^7$ Zellen aufgetragen; d) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA als Größenvergleich.

aus bereits erläuterten Gründen nicht mit Bakterienpräparationen vergleichen. In der ursprünglichen Arbeit von Birnboim und Doly (1979) kann die DNA nach einem RNaseverdauer ohne weitere Reinigung mit Restriktionsenzym geschnitten werden; in Plasmidpräparationen aus D. discoideum sind noch zu viele störende Bestandteile enthalten. So enthält das zur Anzucht verwendete Medium (Ashax) Glucose. Dies bewirkt eine verstärkte Bildung von Glykogen, welches u.a. durch Alkalilöslichkeit und Ethanolgefällbarkeit charakterisiert ist. Die Plasmidisolierung verwendete Methode reichert damit auch Glykogen an (Weeks & Ashworth, 1972); es enthalten jedoch auch mit Bakterien angezogene Zellen hohe Mengen Glykogen. Durch folgende Schritte wird die Qualität von Plasmidpräparationen verbessert:

- (a) In Präparationen aus ganzen Zellen kann der Glykogengehalt durch Zentrifugation in der Kälte zu einem großen Teil beseitigt werden (s. 6.7.2).
- (b) Nachdem die Plasmid-DNA mit dem Zellkern assoziiert ist (s.u.), konnte Plasmid aus dieser Zellfraktion isoliert werden (s. 6.6.7). Diese Plasmidpräparationen sind nur mit geringen Mengen Glykogen kontaminiert und der Gehalt an Proteinen ist weitgehend reduziert.

Um restliche chromosomale DNA, die zu einem großen Teil denaturiert vorliegt, und um weitere störende Bestandteile zu entfernen, wurden folgende Methoden verwendet:

- (c) Geringe Mengen an DNA lassen sich mit Sperminhydro-

chlorid fällen (Hoopes & McClure, 1981, s.6.7.2), wobei die DNA selektiv mit polyvalenten Kationen, wie dem Polyamin Spermin kondensiert. Die Methode ist zur Beseitigung von Glykogen und Protein geeignet. In Abb.9 ist Ddp1 aus einer Plasmidpräparation nach Birnboim & Doly (1979), welches nach dieser Methode gereinigt wurde, zu sehen.

(d) Die Methode von Zasloff et al., 1978 (s.6.7.2) basiert auf der selektiven Phenolextraktion von DNA-Species, die nicht in der cc-Form vorliegen und stellt eine Möglichkeit zur Anreicherung von ccc-DNA dar; damit wurde ein weiterer Nachweis für das Vorliegen von Ddp1 in der cc-Form gebracht (Daten nicht gezeigt), jedoch hat die Methode den Nachteil, daß es bisher auch nach Umfällen und Dialysieren der Plasmid-DNA Schwierigkeiten beim Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen gab.

(e) Über Dichtegradientenzentrifugation erhält man die saubersten Präparationen. Die Plasmid-Bande enthält auch nach wiederholter Zentrifugation noch eine beträchtliche Menge RNA, die durch einen RNase-Verdau beseitigt wurde; auch hier gab es des öfteren Probleme bei Restriktionsenzymspaltungen der DNA.

Bei gereinigten Präparationen, die nicht mit Restriktionsendonukleasen gespalten werden konnten, wurde das DNA-Präzipitat gewaschen, mehrmals mit Ethanol gefällt, die DNA gegen TE dialysiert oder über Elutip gereinigt (s.6.7.2)

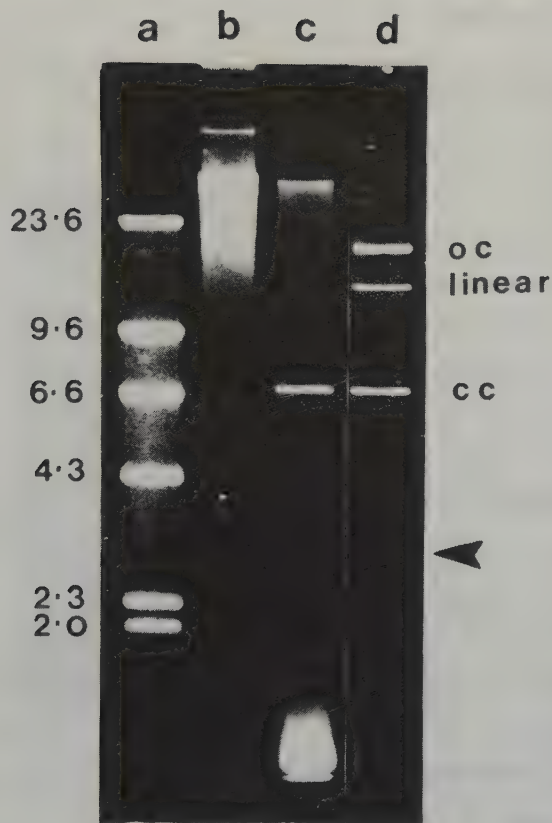


Abb.9. Plasmidpräparationen von Ddp1. Ddp1 aus c) bakteriell bzw. d) axenisch angezogenem HU32 (aus $\sim 6 \times 10^7$ Zellen; b) NP161 (aus $\sim 10^8$ bakteriell angezogenen Zellen). In b ist kein Plasmid nachweisbar; wogegen c und d Ddp1 enthalten, der Pfeil weist auf das, in den bakteriellen Präparationen b und c schwach sichtbare K.aerogenes Plasmid (s.4.3.6); a) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA.

4.3 Charakterisierung von Dictyostelium discoideum- Plasmid Ddp1 aus Stamm HU32

4.3.1 Lokalisierung von Ddp1 in der Zelle

D.discoideum-Zellen lassen sich in mehrere Fraktionen aufteilen (s. 6.6.7): Zellkerne, Mitochondrien und andere membrangebundene Organellen, wie z.B. Mikrosomen und Lysosomen sowie das Cytoplasma. Zur Klärung der Frage, in welchem Kompartiment das Plasmid lokalisiert ist, wurden Zellkerne und Mitochondrien durch sequentielle Zentrifugation (s.6.6.7) von einander getrennt; in der Mitochondrien-Fraktion sind bei dieser Methode auch die anderen membrangebundenen Organellen enthalten. An Mitochondrien, Zellkernen, sowie ganzen Zellen wurden Plasmidpräparationen durchgeführt, wobei die DNA anschließend über Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt, und die DNA-haltigen Fraktionen über Agarosegele charakterisiert wurden (s. Abb.10). In DNA-Präparationen aus Mitochondrien konnte keine Plasmid-DNA nachgewiesen werden (s.Abb.10a). in den Plasmidpräparationen aus Zellkernen bzw. aus ganzen Zellen ist Ddp1 in der cc-Form in dem dichteren Teil des Gradienten zu finden. Mit der restlichen chromosomalen DNA bandet linearisiertes Ddp1 und die oc-Form des Plasmids. Man erhält aus Zellkernen eine mit ganzen Zellen vergleichbare Plasmid-ausbeute.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Plasmid-DNA mit der Fraktion der Zellkerne assoziiert ist, und damit auch mit höchster Wahrscheinlichkeit im Zellkern lokalisiert ist. In

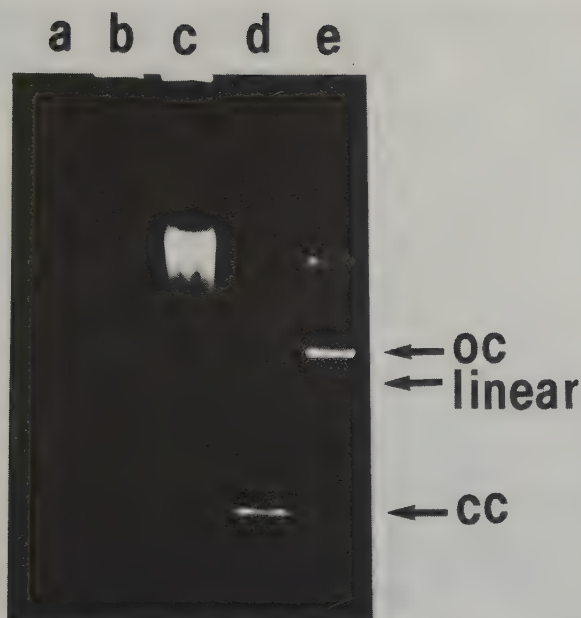


Abb.10. Lokalisierung von Ddp1 in der Zelle. Plasmidpräparationen wurden an Mitochondrien, Zellkernen und ganzen Zellen durchgeführt, und die DNA über Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt, und verschiedene Bereiche des Gradienten auf Plasmid-DNA geprüft; a) aus der mitochondrialen, b und c) aus der Zellkern- und d und e) aus der Präparation aus ganzen Zellen. b und d) sind aus dem "Plasmid"-Bereich, und c und e) aus dem chromosomalen DNA-Bereich des Dichtegradienten.

dieser Arbeit wird dieser Sachverhalt als Lokalisierung im Zellkern beschrieben. Damit wurde es möglich, routinemäßig Plasmidpräparationen an isolierten Zellkernen durchzuführen, wodurch die Qualität der Plasmidpräparationen erheblich verbessert werden konnte.

4.3.2 Elektronenmikroskopische Analyse von Ddp1

Ddp1 (mit Spermin gefällt bzw. über Dichtegradienten gereinigt) wurde in wäßriger Ammoniumacetat-Lösung in Gegenwart von Cytochrom c gespreitet (Fisher et al, 1978). In dem verwendeten wäßrigen System ist einzelsträngige DNA als dichte, buschförmige Struktur zu erkennen, die durch zufällige Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Basenpaaren entstehen; doppelsträngige DNA erscheint als leicht gebogenes Filament. Abb.11 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von circulärem Ddp1 (oc-Form).

Die Konturlänge von etwa 30 Plasmidmolekülen Ddp1 wurde ausgemessen und die Größe bestimmt, durch Vergleich mit ebensovielen Plasmid-DNA-Molekülen bekannter Größe (K.aero-genes-Plasmid pTW16, s.4.3.6), bzw. über den Vergrößerungsfaktor berechnet. Die Konturlänge der Moleküle, aus der sich eine Größe von ~13kbp für Ddp1 berechnen ließ, schwankte um $\pm 1.5\%$. Die Größe liegt etwa 6% unter dem Wert, der über Gelelektrophorese durch Addition von Restriktionsfragmente (s.4.3.4) erhalten wurde.

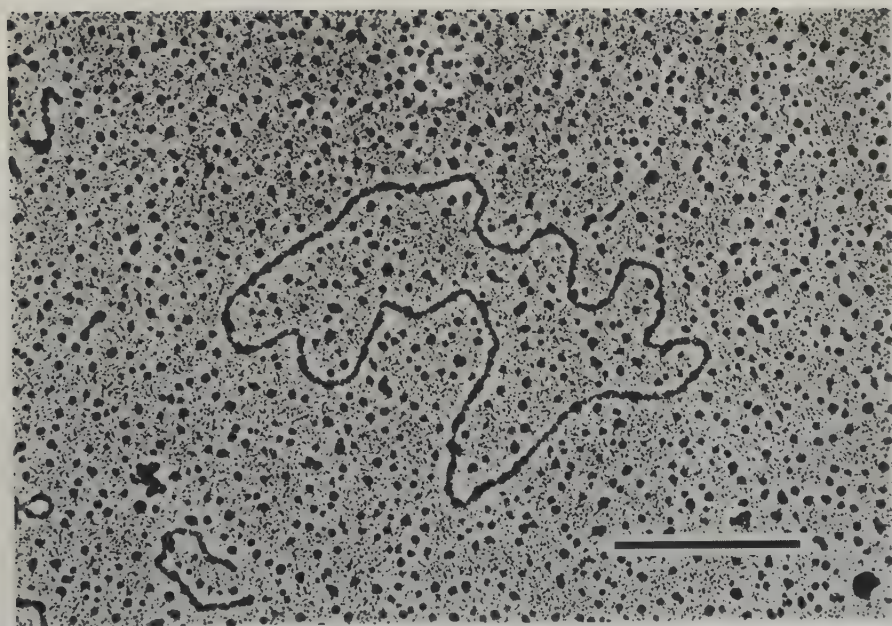


Abb.11. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Ddp1. Der Balken entspricht $0.5\mu\text{m}$.

4.3.3 Identifizierung des Bandenmusters von Ddp1

In einer Spermin-gereinigten Präparation (Hoopes & McClure, 1981; s. 6.7.2) von Ddp1 sind 1 bis 3 Banden deutlich zu erkennen; weiterhin sind noch mehrere schwächere Banden, in einem insgesamt etwas diffusen, hochmolekularen Bereich, sichtbar. Dieser Bereich wird als Bande 4 bezeichnet (s. Abb.12). Zur Aufklärung der Verwandtschaft wurde die DNA der verschiedenen Banden durch Elektroelution aus einem präparativen Gel isoliert, und mit Restriktionsenzym gespalten (s. 6.7.2).

Bande 1 mit der höchsten elektrophoretischen Mobilität läßt sich schon durch verschiedene Reinigungsmethoden als Plasmid-DNA in der cc-Form bestätigen: man erhält diese Form nach Dichtegradientenzentrifugation (s. Abb.10) aus dem dichteren Bereich des Gradienten und nach saurer Phenolextraktion (Zasloff et al., 1978; Daten nicht gezeigt). Beide Methoden reichern die cc-Form des Plasmids an.

Wie in Abb.12A und B zu sehen ist, wird Bande 1 (cc-Form) durch Scheren bei der Elektroelution teilweise in Bande 3 (oc-Form) umgewandelt (s. Abb.12Aj). Bande 3 (oc-Form) wird zu einem geringen Teil linearisiert, d.h. in Bande 2 überführt (s. Abb.12Bj). Alle Banden des Plasmids werden in Bande 2 überführt, wenn man ein Restriktionsenzym verwendet, das das Plasmid einmal schneidet (z.B. SphI, s. 4.3.4, Abb.13). Alle Banden ergaben bei einem Restriktionsenzymverdau mit EcoRI, HindIII und BclI (s. Abb.12A + B; für weitere Details s. 4.3.4) das gleiche Fragmentmuster. Bande 4 ist

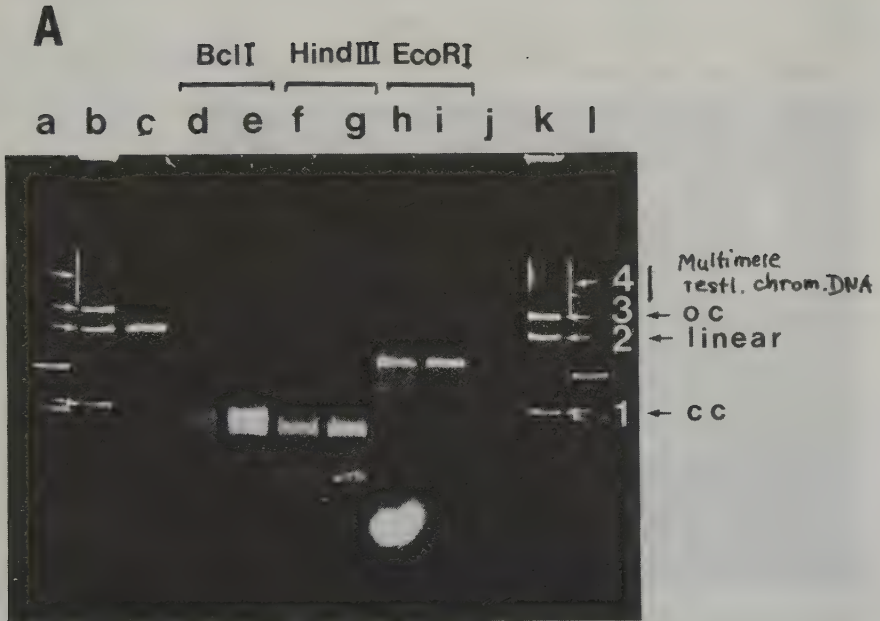


Abb.12A und B. Identifizierung der verschiedenen Ddp1-Banden auf einem Agarosegel.

Die DNA wurde isoliert nach einer Modifikation von Birnboim & Doly (1979) und mit Spermin gefällt (Hoopes & McClure, 1981). In den Spuren a und l ist HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA als Marker aufgetragen, und in b und k ungeschnittenes Ddp1.

Abb.12A. c) zeigt Bande 2: lineares Ddp1, welches in d, f und h mit BclI, HindIII bzw. EcoRI geschnitten wurde. j) zeigt die ungeschnittene Bande 1: cc-Form, welche in e, g und i) mit BclI, HindIII bzw. EcoRI geschnitten wurde.



Abb.12B. c) zeigt Bande 4: Multimere von Ddp1 und restliche chromosomale DNA, welche in d, f, und h mit BclI, HindIII bzw. EcoRI geschnitten; j) zeigt die ungeschnittene Bande 3: oc-Form, in e, g und i) mit BclI, HindIII bzw. EcoRI geschnitten.

nicht völlig frei von chromosomaler DNA, jedoch enthält der Bereich genügend Multimere von Ddp1, so daß auch hier das Ddp1-spezifische Restriktionsmuster zwischen den zusätzlichen chromosomalen Banden zu erkennen ist.

4.3.4 Restriktionsmuster und Restriktionskarte. Klonierung von Ddp1

Zur weiteren Charakterisierung von Ddp1 wurde das Muster und die Größe der Fragmente bestimmt, die durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entstehen.

Abb.13 zeigt das Ddp1-spezifische Restriktionsmuster. In Tab.IV sind die Erkennungssequenzen der verschiedenen Restriktionsendonukleasen, ihr AT-Gehalt, sowie die Anzahl ihrer Schnittstellen in Ddp1 aufgelistet und in Tab.V die Größe, der bei der Spaltung entstehenden Fragmente.

Die Restriktionskarte von Ddp1 (s.Abb.14) wurde durch Doppelspaltungen mit Restriktionsendonukleasen von T.Ward (Ward et al., in Vorber.) aufgestellt, sowie die Klonierung von Ddp1 und Ddp1-Fragmenten in das bakterielle Plasmid pBR322 (Sutcliffe, 1978). In Tab.VI sind die verschiedenen Hybrid-Plasmide aufgelistet. Im Laufe der Untersuchungen wurde durch Addition von Restriktionsfragmenten die Größe von Ddp1 von 13.8kbp bestätigt. Die Größe stimmt gut mit dem Wert, der über elektronenmikroskopische Analyse erhalten wurde überein (s. 4.3.2), wobei der Wert, der durch Addition von Restriktionsenzymfragmente entsteht, den genaueren Wert darstellt.

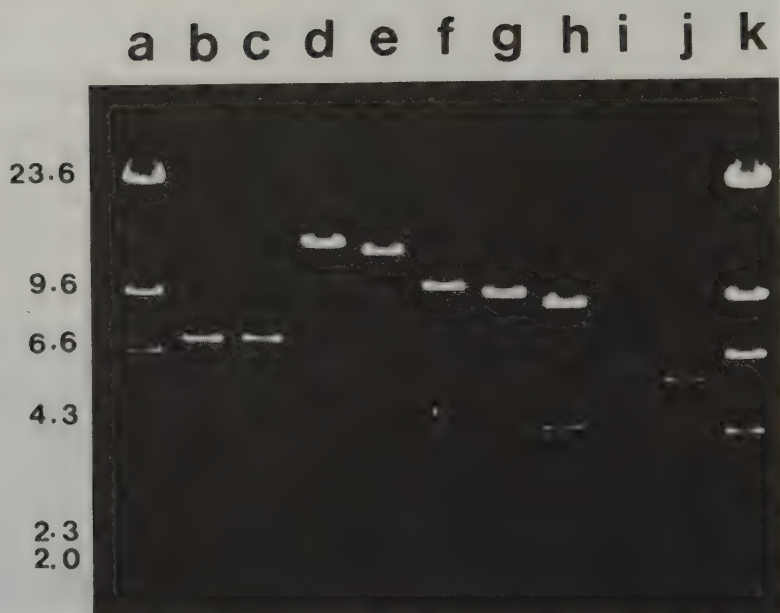


Abb.13. Restriktionsmuster von Ddp1 (CsCl-gereinigt) unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme. a + k) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA. b) ungeschnittenes, c) Sall-, d) SphI-, e) BglII-, f) EcoRI-, g) EcoRV-, h) PstI-, i) BclI- und j) HindIII-verdautes Ddp1. In i + j) ist Ddp1 nur partiell geschnitten.

Tab.IV. Restriktionsenzym-Schnittstellen in Ddp1

Restriktions- enzym	Zahl d. Schnitt- stellen in Ddp1	Erkennungs- sequenz	AT-Gehalt (%)
HindIII	6	AA/GCTT	67
ClaI*	4	AT/CGAT	67
NdeI	3	CA/TATG	67
EcoRI	3	G/AATTC	67
EcoRV	3	GATAT/C	67
BclI*	2	T/GATCA	67
BglII	2	A/GATCT	67
HpaI	1-2	GTT/AAC	67
KpnI	3	GGTAC/C	33
PstI	2	CTGCA/G	33
NcoI	1	C/CATGG	33
PvuI	1	CAG/CTG	33
SphI	1	GCATG/C	33
BamHI	0	G/GATCC	33
PvuI	0	CGAT/CG	33
SalI	0	G/TCGAC	33
MluI	0	A/CGCGT	33
SstI	0	GAGCT/C	33
XhoI	0	CT/CGAG	33
AvaI	0	C/PyCGPuG	0-33
BglI	0	GCCNNNN/NGGC	0
SmaI	0	CCC/GGG	0
XmaIII	0	C/GGCCG	0

*: Minimumanzahl von Schnitten des Restriktionsenzym, da evtl. durch Methylierung weitere Schnittstellen nicht erkannt werden können.

N: beliebige Nukleotide

Pu: Purin

Py: Pyrimidin

Tab.V. Größe der DNA-Fragmente (in kbp) von Ddp1 bei Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen

HindIII	: 5,7; 3,9; 2,0; 1,5; 0,6; ~0,1
ClaI	: 5,2; 3,8; 2,9; 1,5
EcoRI	: 9,9; 2,8; 1,1
EcoRV	: 8,4; 3,5; 0,9
BclI	: 7,0; 6,8
BglII	: 13,0; 0,8;
HpaI	: 13,0; 0,1;
KpnI	: 10,6; 1,6; 1,6
PstII	: 9,5; 4,3;

Tab.VI. Hybrid-Plasmide aus Ddp1 und pBR322

pBMW1/ pBMW2	das 13kbp BglII-Fragment von Ddp1 kloniert in beiden Orientierungen in der BamHI-Schnittstelle von pBR322
pBMW3/ pBMW4	Ddp1, linearisiert an der einzigen SphI-Schnittstelle, in beiden Orientierungen in die einzige SphI-Schnittstelle von pBR322 kloniert
pBMW9	das 800bp BglII-Fragment von Ddp1 kloniert in einer der beiden möglichen Orientierungen in die BamHI-Schnittstelle von pBR322

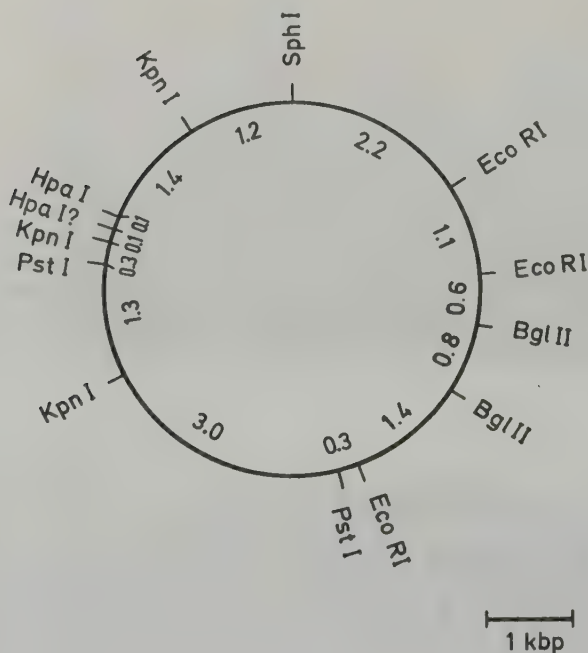


Abb.14A. Restriktionskarte von Ddp1 (circular). Die mit einem Fragezeichen versehene HpaI-Schnittstelle ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen.

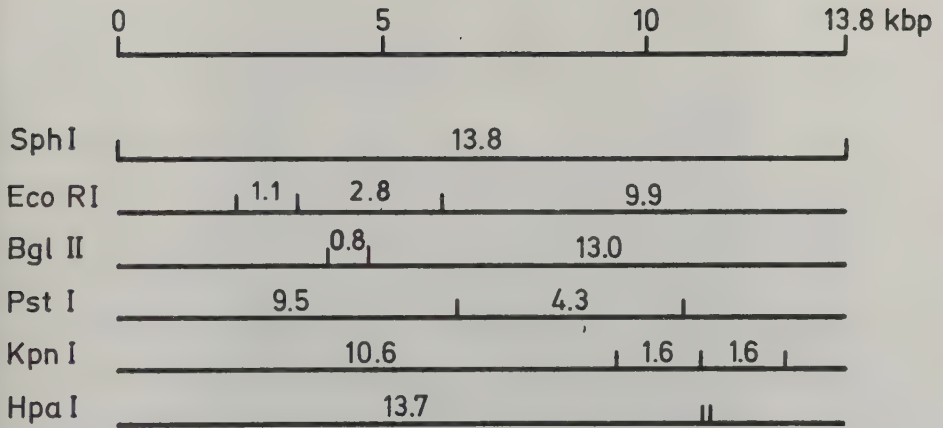


Abb.14B. Restriktionskarte von Ddp1, linearisiert an der einzigen SphI-Schnittstelle. Die zweite HpaI-Schnittstelle ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen, und deshalb mit einem Fragezeichen versehen.

4.3.5 Vergleich von Ddp1 aus axenisch und auf festem Medium angezogenen HU32-Zellen

Ddp1 wurde aus axenischen und auf festem Medium unter selektiven Bedingungen angezogenen HU32-Zellen isoliert. Es wurde geprüft, ob Unterschiede zwischen den beiden Plasmid-Präparationen bestehen (s. Abb. 15).

In der "bakteriellen" HU32-Präparation (Abb. 15g) ist hauptsächlich die cc-Bande zu sehen, während in der axenischen Präparation (Abb. 15h) oc-Bande und die lineare Form etwas besser sichtbar sind; die entsprechenden Banden weisen die gleiche elektrophoretische Mobilität auf. Bei Spaltung mit den Restriktionsenzymen PstI, HindIII und EcoRI ergeben beide Präparationen das gleiche Fragmentmuster. In den Spuren mit Ddp1 aus auf festem Medium angezogenen Zellen, ist zusätzlich das K.aerogenes-Plasmid pTW16 zu sehen, welches mit einem Pfeil gekennzeichnet ist (s. Abb. 15a, c, e und g; vgl. 4.3.6).

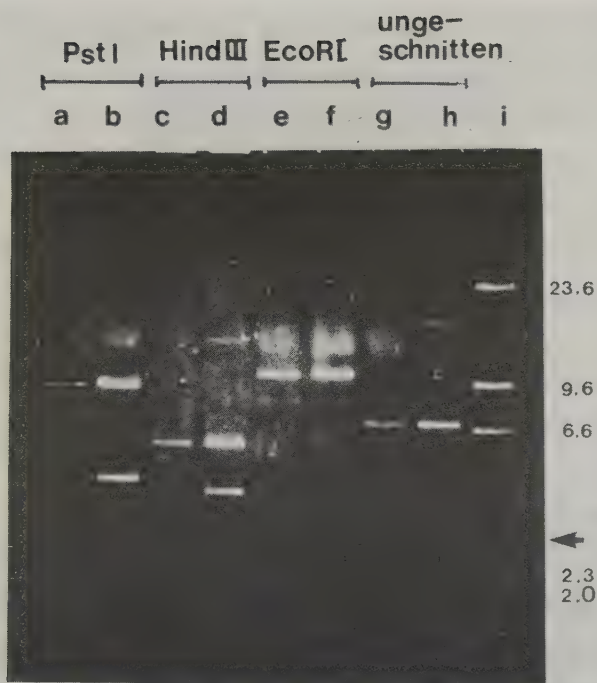


Abb.15. Vergleich von Ddp1 (mit Spermin gefällt) aus axenisch und auf festem Medium mit Bakterien (in Gegenwart von CoCl_2) angezogenen HU32-Zellen: a, c, e und g ist Ddp1 aus einer "bakteriellen" Präparation, und b, d, f und h aus einer Präparation von axenischen Zellen zu sehen; a und b wurden mit PstI, c und d mit HindIII, und e und f mit EcoRI geschnitten; g und h zeigen ungespaltenes Ddp1. In den "bakteriellen" Spuren a, c, e und g ist das K.aerogenes Plasmid pTW16 in der cc-Form als schwache Bande zu sehen. Es wird von den hier verwendeten Enzymen nicht geschnitten (s. 4.3.6). Das Schnittmuster von a und b, c und d, sowie e und f ist identisch. In der HindIII-Spaltung lassen sich die kleineren Fragmente auf dem 0.5% Agarosegel nicht nachweisen. i) HindIII-geschnittene λ -Phagen-DNA.

4.3.6 Vergleich von Ddp1 mit K.aerogenes-Plasmid pTW16

Da eukaryontische Plasmide relativ selten sind, und D.discoideum sich durch Phagocytose ernährt, bestand die Möglichkeit, daß das D.discoideum-Plasmid bakteriellen Ursprungs sein könnte. Diese Hypothese wurde bestärkt durch die Tatsache, daß der zur Anzucht verwendete Bakterienstamm cobaltresistent ist. Dieser K.aerogenes-Stamm verfügt über mindestens ein Plasmid, welches pTW16 benannt wurde (s. Abb.16), und von Dr. Y. Li charakterisiert, und auf seine Fähigkeit E.coli zur Cobaltresistenz zu transformieren, untersucht wurde (Li et al., in Vorber.). Das Plasmid hat eine Größe von ~5.5kb (s. Abb.16).

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit war es wichtig, Homologien zwischen Ddp1 und pTW16 auszuschließen. Das Restriktionsmuster der beiden Plasmide unterscheidet sich grundlegend: so gibt es z.B. in pTW16 keine Schnittstellen für EcoRI, PstI und HindIII, wogegen Ddp1 von EcoRI dreimal, von PstI zweimal und von HindIII sechsmal geschnitten wird (s. Abb.15). Dagegen wird pTW16 von AvaI viermal, SmaI zweimal und BamHI einmal geschnitten, wogegen Ddp1 keine Schnittstellen für diese Enzyme hat (vgl. Tab.IV; Li et al, in Vorber.). pTW16 und chromosomale K.aerogenes-DNA wurden in einer Southern-blot-Analyse mit Ddp1 hybridisiert. Es läßt sich keine Kreuzhybridisierung und damit keine Homologie zwischen Ddp1 und K.aerogenes-DNA (chromosomal und pTW16) nachweisen (Daten nicht gezeigt).

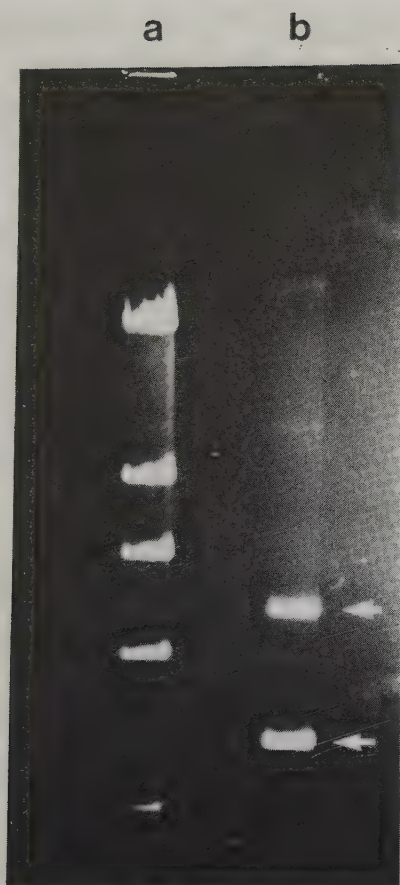


Abb.16. K.aerogenes-Plasmid pTW16.
a) HindIII-geschnittene λ -Phagen-DNA, b) pTW16 (CsCl-gereinigt) in der oc- und cc-Form.

4.3.7 Vergleich mit anderen extrachromosomalen Elementen

Die Frage, ob eine Verwandtschaft von Ddp1 mit den anderen extrachromosomalen Elementen von D.discoideum, dem ribosomalen Palindrom und dem circulären, mitochondriellen Genom besteht (vgl. 3.5), wurde über Southern blot-Analyse beantwortet.

Da in einer Präparation von D.discoideum-Gesamt-DNA die rDNA und mtDNA mengenmäßig stark überrepräsentiert sind (s.3.5), gibt mit Restriktionsenzym geschnittene DNA aus ganzen Zellen, auf einem Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel ein für die verschiedenen Wildtypstämme typisches Restriktionsmuster. In Abb.17 ist das für von NC4 abstammenden Stämme typische Bandenmuster von 7 EcoRI-Banden der rDNA (vgl. Abb.4) und 4 EcoRI-Fragmenten der mtDNA (vgl. Abb.5) zu sehen. Abb.18A zeigt EcoRI-geschnittene DNA, aus ganzen Zellen verschiedener Stämme isoliert. Die DNA der einzelnen Stämme wurde zweimal aufgetragen, wobei einer Serie verschiedene Konzentrationen Ddp1 zugegeben wurden, um eine interne Kontrolle der Nachweisbarkeit zu haben. Es wurden jeweils 5µg Gesamt-DNA aufgetragen. Dies entspricht $\sim 10^8$ haploiden nuklearen Genomäquivalenten entsprechen (s. Tab.VII). In dieser DNA-Präparation wurden jedoch ganze Zellen verwendet, und die DNA ist nicht völlig frei von RNA. Nach Korrektur entspricht die DNA-Menge mindestens 5×10^7 haploiden Zellkern-Genomen. In einer Southern blot-Analyse (s.Abb.18B) konnte unter Verwendung von Ddp1 als Probe keine Verwandtschaft zu den Fragmenten der rDNA oder mtDNA nachgewiesen werden.

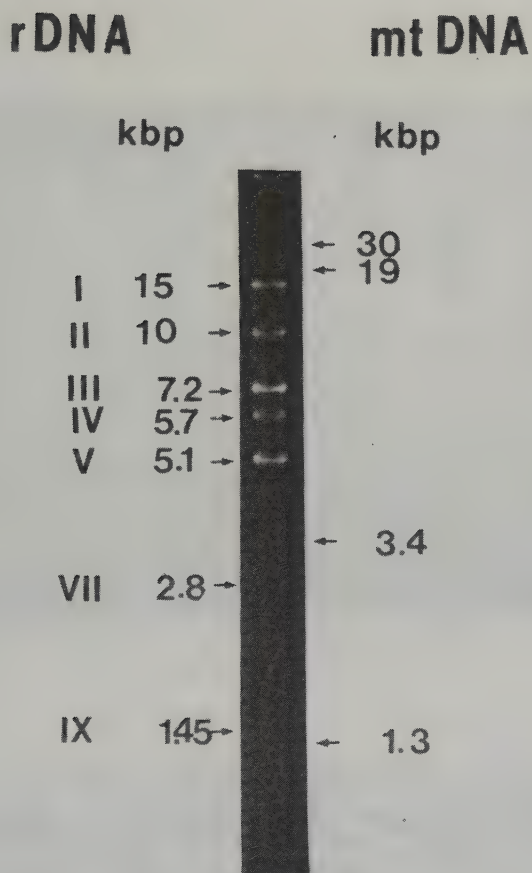


Abb.17. EcoRI-Restriktionsmuster der Gesamt-DNA eines von NC4 abstammenden Stammes (AX3). Die nicht gekennzeichnete Bande lässt sich durch partielle Spaltung erklären.

A

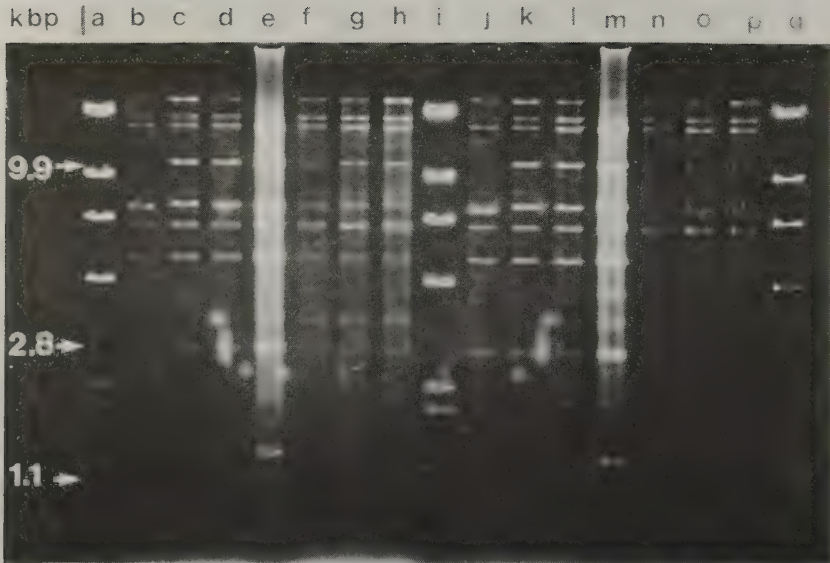


Abb.18A. EcoRI-geschnittene Gesamt-DNA verschiedener Stämme (CsCl-gereinigt).

b-h) und i-p) zeigen die gleiche Serie von DNA aus folgenden Stämmen: b+j) HU1231, c+k) HU1180 in Gegenwart von CoCl_2 angezogen, d+l) HU1180, e+m) AX3, f+n) HU978, g+o) HU1482, h+p) X2.

die Spuren b-h enthalten DdpI in folgenden Konzentrationen: b) 2ng, c) 1.8ng, d) 1.5ng, e) 1ng, f) 0.5ng, g) 0.2ng, h) 0.1ng.

a, i, und q) zeigen HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA.

In b+j ist ein ribosomaler Polymorphismus sichtbar. Mit Ausnahme von HU1231 stammen alle Stämme von NC4 ab und haben das gleiche Muster an rDNA-Fragmenten. HU1231 ist ein axenisch wachsender V12-Stamm (s.Abb.6), in dem das rDNA-Fragment II (10kbp) nicht vorhanden ist: stattdessen entstehen Fragmente verschiedener Größe (Welker et al., in Vorber.).

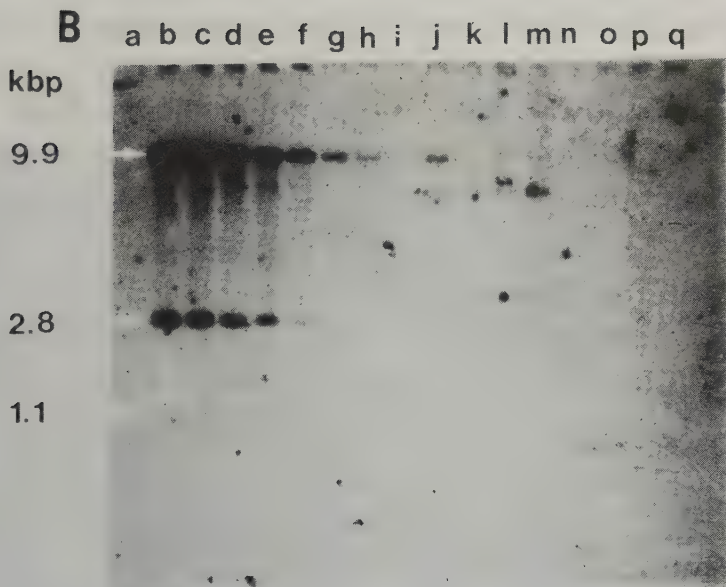


Abb.18B. Southern blot-Analyse zu Abb.18A, unter Verwendung von ^{32}P -markiertem Ddp1 (aus pBMW3) nach stringentem Waschen des Nitrozellulose-Filters (s. 6.10; 55% Formamid, 1x SSC).

Eine Kopie Ddp1 entspricht 0.7ng pro 2.5 μg nDNA. In Abb.18f ist zu HU978-DNA (ohne endogenes Plasmid) 0.5 μg Ddp1 zugegeben; dies entspricht weniger als einer Kopie des Plasmids pro Zelle, wobei die verschiedenen EcoRI-Fragmente von Ddp1 nachweisbar sind. In den gezeigten Stämmen läßt sich kein endogenes Plasmid nachweisen. Lediglich in HU1231 scheinen geringe Mengen Plasmid enthalten zu sein. Bei einer Korrelation mit den Kontrollen läßt sich die sehr geringe Kopienzahl von weniger als 1 Kopie/ 3 Zellen berechnen. Dieser Punkt wird in 4.4. ausführlicher behandelt.

4.3.8 Kopienzahl von Ddp1 aus HU32

Für eine genauere Bestimmung der Kopienzahl von Ddp1 in HU32 wurde Gesamt-DNA aus axenisch angezogenen Stämmen, u.a. HU32 und HU1180 isoliert (s.6.7.3). Bei HU1180 handelt es sich um einen Stamm mit einer chromosomalen Cobaltresistenz auf Kopplungsgruppe VII. HU1180 wurde in axenischer Kultur mit ($150\mu\text{g/ml CoCl}_2$) und ohne den Zusatz von CoCl_2 angezogen, um die Anzucht mit CoCl_2 und eine chromosomale Cobaltresistenz mit der cob-354-Mutation vergleichen zu können. Abb.19 zeigt ungeschnittene Gesamt-DNA. In Stamm HU32 sind Plasmid-Banden auf einem mit Ethidiumbromid angefärbten Gel zu erkennen, wodurch die hohe Kopienzahl von Ddp1 in HU32 offensichtlich wird. Über Southern blot-Analyse konnte in keinem anderen Stamm (s. jedoch HU1231 in Abb.18B; s. auch 4.4) Plasmid-DNA mit Homologie zu Ddp1 nachgewiesen werden.

In die Berechnung der Kopienzahl gehen die verschiedenen Größencharakteristika des D.discoideum-Genoms ein; sie sind in Tab.VII zusammengefaßt. Aufgrund dieser Berechnungen kann die Menge Ddp1, die z.B. einer Kopie pro Zelle, entspricht mit Verdünnungen von HU32-Gesamt-DNA verglichen werden (s. Abb.20). Aufgrund dieser Daten liegt die Kopienzahl im Bereich von etwa 200 Kopien pro haploidem Zelläquivalent.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Kopienzahl bietet die Korrelation mit ribosomalen Fragmenten. Der EcoRI-Verdau von HU32-Gesamt-DNA erwies sich als ungeeignet, da die Ddp1-Fragmente in relativer Nähe der ribosomalen

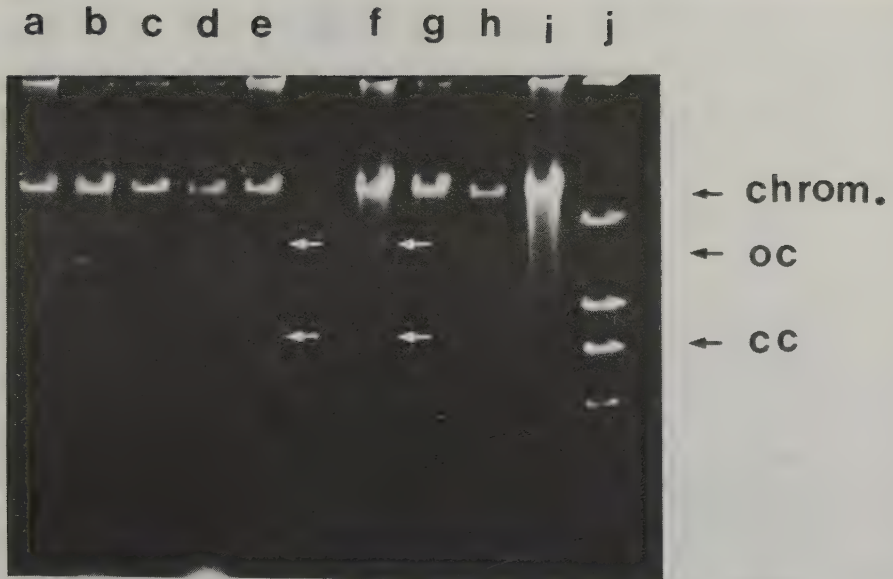


Abb.19. Ungeschnittene DNA aus ganzen Zellen verschiedener *D. discoideum*-Stämme.

Die chromosomale DNA ist hochmolekular und weist keine Degradation auf. Auf dem mit Ethidiumbromid angefärbten Gel ist nur in HU32 Plasmid-DNA zu sehen, wobei die Pfeile auf die oc- und cc-Form von Ddp1 hinweisen.

Unter Verwendung dieses Gels für eine Southern blot-Analyse und mit Ddp1 als Probe konnten auch die lineare Form und Multimere in HU32 nachgewiesen werden, wogegen in den anderen Stämmen kein Plasmid nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Alle Stämme wurden axenisch angezogen; a) HU1231, b) HU1180 und c) HU1180 + 150 µg/ml CoCl₂ angezogen, d) HU978, e) und f) HU32 + 150 µg/ml CoCl₂, g) HU1482, h) X2, i) AX3 und j) HindIII-verdaute λ-Phagen-DNA.

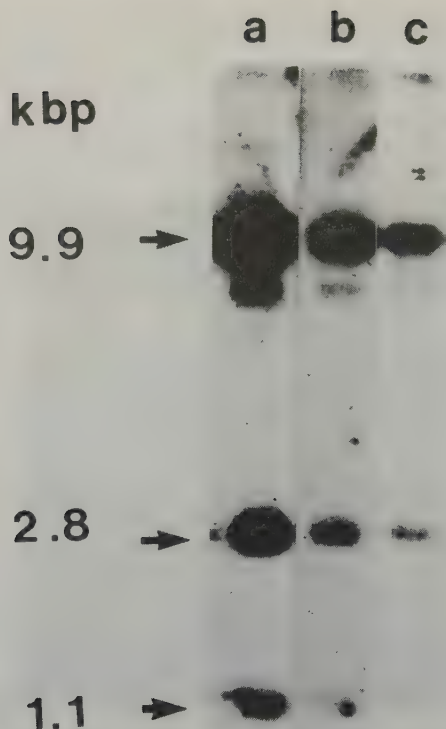


Abb.20. Verdünnungen von EcoRI gespaltenen HU32-Gesamt-DNA hybridisiert mit Ddp1 (aus pBMW3). a) und b) das Äquivalent zu etwa 5×10^7 Zellen, 1:100 bzw. 1:200 verdünnt. c) 1 ng Ddp1, entspricht etwas mehr als einer Kopie pro Zelle. In a und b ist eine relativ schwache Bande mit einer Größe von ~7 kbp zu sehen. Es handelt es sich dabei wahrscheinlich um nicht geschnittenes Ddp1 (cc-Form).

Tab.VII. Größencharakteristika des D.discoideum-Genoms.

10^9 kbp = 1ng DNA

10^8 mononukleare Zelläquivalente = 5×10^{12} kbp = 5µg nuklearer DNA.

1 Kopie Ddp1 in 10^8 Zellen = 1.4×10^9 kbp = 1.4ng

1 Kopie rDNA (Dimer) in 10^8 Zellen = 8.8×10^9 kbp = 8.8ng

90 Kopien rDNA (Dimer) in 10^8 Zellen = 8×10^{11} kbp = 800ng
oder 0.8µg

Banden liegen (s. Abb.18A und B). Das Restriktionsenzym SphI schneidet Ddp1 nur einmal, wodurch auch das gesamte Ddp1 (s. Abb.21g) in einer Bande bei ~13.8kbp gesammelt wird. Die Bande des linearisierten Ddp1 (s.Pfeil) liegt gut sichtbar zwischen den rDNA-Banden (s. Abb.21). Die hochmolekularen Banden können teilweise durch mtDNA bedingt sein. Die zusätzliche Bande in HU32 stimmt mit Ddp1 aus pBMW3 überein (s. Abb 21Ak). In einer Southern blot-Analyse wurde die Vollständigkeit der Spaltung von Ddp1 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Wichtig ist der Vergleich von HU32 und HU1180. Bei HU1180 handelt es sich um einen Stamm, der über eine stabile chromosomale Cobaltresistenz verfügt, und kein Plasmid enthält (s. auch Abb.18).

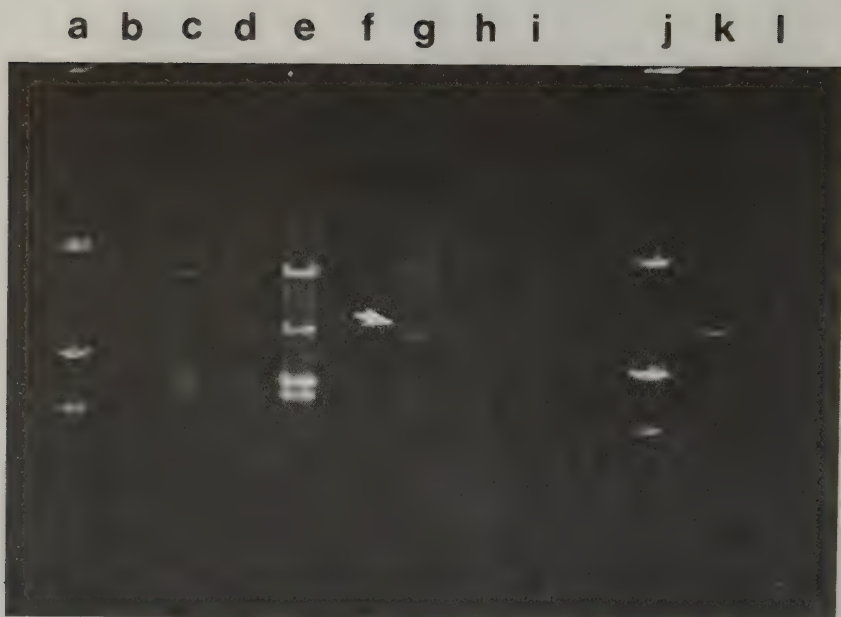


Abb.21. SphI-geschnittene Gesamt-DNA aus verschiedenen D.discoideum-Stämmen.

a+j) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA:

alle weiteren Proben wurden mit SphI geschnitten: b) HU1231, c) HU1180 in Gegenwart von $150\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 angezogen, d) HU1180 ohne Zusatz von CoCl_2 angezogen, e) ΔX3 , f) HU978, g) HU32, h) HU1482, i) X2 k) pBMW3 und l) pBR322.

4.3.9. Integrierte Kopie von Ddp1

Weiterhin mußte die Frage nach dem Vorhandensein einer integrierten Kopie beantwortet werden. Da die oc-Form und lineares Ddp1 in einem Gradienten mit der chromosomalen DNA läuft, und bedingt durch die hohe Kopienzahl von Ddp1 ist es nicht möglich, DNA dieses Stammes zu verwenden, um eine einzelne, integrierte Kopie nachweisen zu können. Deswegen wurde DNA von verschiedenen, axenisch angezogenen, plasmidfreien Stämmen, z.B. dem Elternstamm X2, und dem von der Cobaltresistenz und Ddp1 geheilten Stamm HU978 untersucht; weiterhin wurden die DNA aus folgenden Stämmen verwendet: HU1180, einem Stamm mit einer chromosomalen Cobaltresistenz, der sowohl ohne als auch in Gegenwart von CoCl_2 angezogen wurde, und AX3 und HU1482, bei dem es sich um X2 nach langer axenischer Passage handelt (s. Abb.18B). In der Kontrolle konnte das 1.1kb-Fragment von Ddp1 bei einer Konzentration von weniger als einer Kopie/Zelle ($\sim 40\text{pg}$ in der 1.1kbp-EcoRI-Fragment von Ddp1) nachgewiesen werden konnte (s. Abb.18f), wogegen es in den Gesamt-DNAs der untersuchten Stämme keinen Hinweis auf eine integrierte Kopie gab (s. Abb.18j-p). Zu der EcoRI-Southern blot-Analyse (Abb.18)) wurden analoge Versuche mit HindIII, PstI und SphI geschnittener Ganzzellen-DNA durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung der in Abb.18 gezeigten Stämme gab es auch bei diesen Restriktionsenzymen keinen Hinweis auf eine im D.discoideum-Genom stabil integrierte Kopie.

4.4 Plasmid in anderen Stämmen

Das Vorhandensein der instabilen Kobaltresistenz hatte ursprünglich zu der Vermutung geführt, daß diese aufgrund ihrer Instabilität plasmidcodiert sein könnte. Anfangs konnte weder in dem Elternstamm X2 noch in dem von der Kobaltresistenz geheilten Stamm HU978 Plasmid nachgewiesen werden. Auch in genomischen Southern blots ließ sich nur in HU32, und nicht in X2, HU978 oder HU1231 (axenisch wachsender V12), Plasmid-DNA nachweisen. Als jedoch weitere Stämme untersucht wurden, wurden in verschiedenen Stämmen bis hin zu den Wildtypstämmen NC4 und V12 Plasmide nachgewiesen, welche mit Ddp1 eine sehr große Ähnlichkeit, wenn nicht Identität, haben. Plasmid-DNA, welche aus von NC4 bzw. V12 abstammenden Stämmen isoliert wurde, erhielt die Bezeichnung Ddp2 bzw. Ddp3.

In einer nicht über CsCl-gereinigten DNA-Präparation von NC4 bzw. V12 (aus ganzen Zellen; s. 6.11.2) sind die Plasmide Ddp2 und Ddp3 in ähnlich hoher Kopienzahl wie Ddp1 in HU32 zu finden (s. Abb.22; vgl. Abb.20). Dies wurde weiterhin durch Plasmidpräparationen an den verschiedenen Stämmen gezeigt, wobei DNA aus vergleichbaren Zellmengen aufgetragen wurde (s. auch Abb.30, c und d).

Die Plasmide Ddp1, Ddp2 und Ddp3 ergeben bei Restriktionsenzymspaltung das gleiche Restriktionsmuster (s. Abb.23). Weiterhin hybridisieren die Plasmide, bzw. die verschiedenen Restriktionsfragmente zu einem Grad mit Ddp1 der auf eine sehr hohe Ähnlichkeit, wenn nicht Identität der Plasmide

schließen läßt (s. Abb.23). Ferner hybridisieren alle drei Plasmide mit pBMW9, welches das 800bp-BglII-Fragment von Ddp1 enthält (Daten nicht gezeigt); für die Bedeutung dieses Fragmentes, s. 4.5).

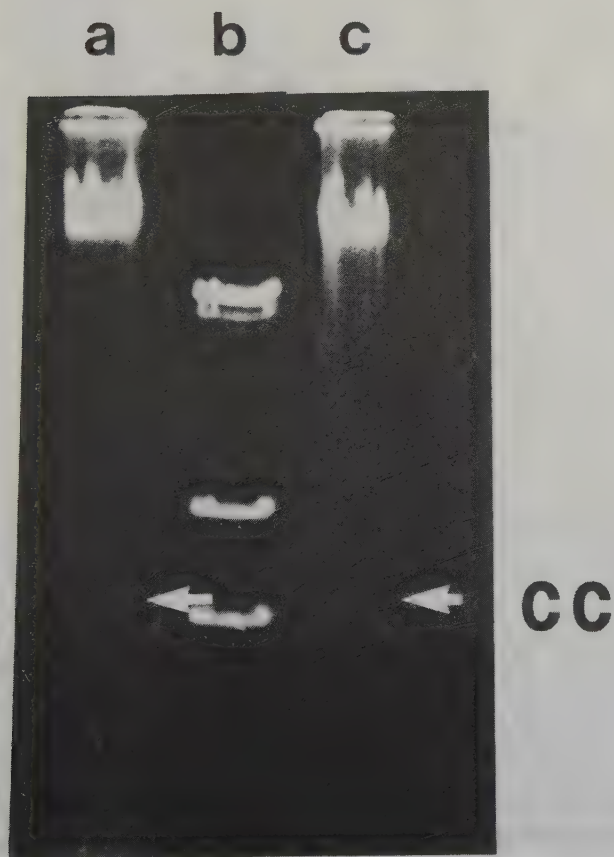


Abb.22. Gesamt-DNA aus a) NC4 und c) V12 (isoliert nach 6.11.2). Der Pfeil weist auf Ddp2 bzw. Ddp3 in der cc-Form; b) HindIII-geschnittene λ -Phagen-DNA.

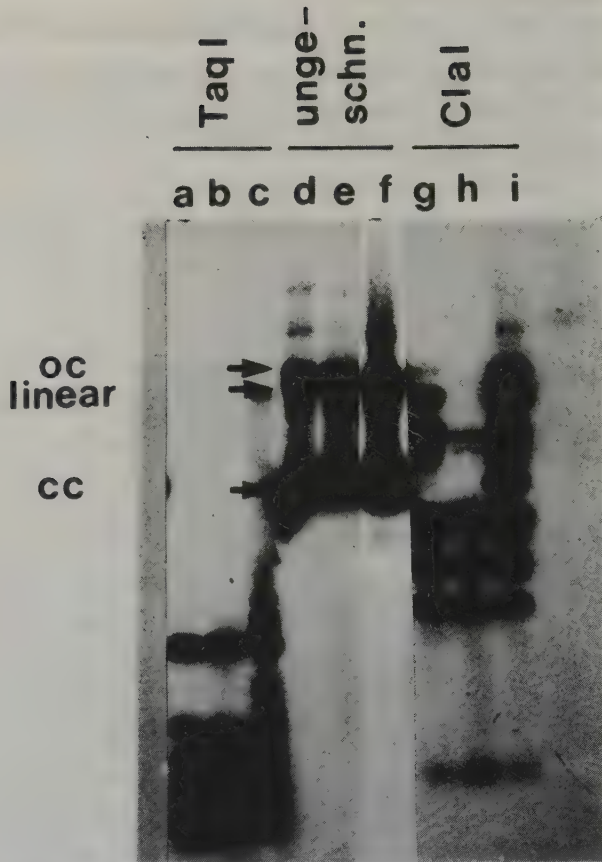


Abb. 23. Restriktionsverdau und Nachweis der Homologie der Plasmide Ddp1, Ddp2 und Ddp3 über Southern blot-Analyse. Es wurden gleiche Mengen CsCl-gereinigter Plasmid-DNA (Ddp1, Ddp2 und Ddp3 aus $\sim 10^6$ Zellen/Spur aufgetragen. a, d, und g zeigt Ddp3; b, e, und h zeigt Ddp2; c, f und i zeigt Ddp1. Je eine Plasmid-Serie ist mit TaqI, ungeschnitten oder mit Clal behandelt. In c und i sind partielle Spaltungen besonders deutlich zu sehen. In einem Verdau mit TaqI hat das größte Fragment ein Molekulargewicht von etwas mehr als 2kbp. Mit abnehmenden Molekulargewicht werden die Banden auf dem Agarosegel etwas diffuser. Die kleinsten Fragmente sind nicht mehr auf dem Gel zu sehen.

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, daß einige der auf Silicagel konservierten Versionen von X2 das Plasmid Ddp2 enthielten. Ebenso verfügte auch die ursprüngliche Version von HU978, obwohl der Stamm schon cobaltsensitiv war, noch über Ddp1. Die Stämme wurden durch weitere axenische Anzucht unter nicht selektiven Bedingungen von Plasmid geheilt. In Abb.24 sind Ergebnisse zusammengefaßt, die zeigen, daß weitere 40 Generationen unter nicht selektiven Bedingungen zum völligen Verlust von Ddp1 in HU978 führten. Die Ergebnisse zeigen, daß in diesem Fall das Heilen von Ddp1 und der instabilen Cobaltresistenz nicht völlig synchron verlaufen ist.

Abb.25 zeigt Plasmidpräparationen aus u.a. diesen Stämmen nach einer längeren axenischen Passage, verglichen mit NC4 und V12 nach längeren Passage auf festem Medium. Plasmid konnte nur in NC4, V12 und HU32 (unter selektiven Bedingungen angezogen) nachgewiesen werden. In Abb.26 sind zum Vergleich mit Abb.25 die Ergebnisse zusammengefaßt, die man unter Verwendung einer Schnellmethode, der in situ-Gel-Lyse, erhält. Mit beiden Methoden erhält man vergleichbare Ergebnisse, sofern eine Southern blot-Analyse durchgeführt wird. Die Modifikation der Methode von Birnboim & Doly (1979; s.Abb.25) hat den Vorteil, der auch zu der Entdeckung von Ddp1 führte: man erhält bereits auf dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel eindeutige Hinweise auf Plasmid-DNA.

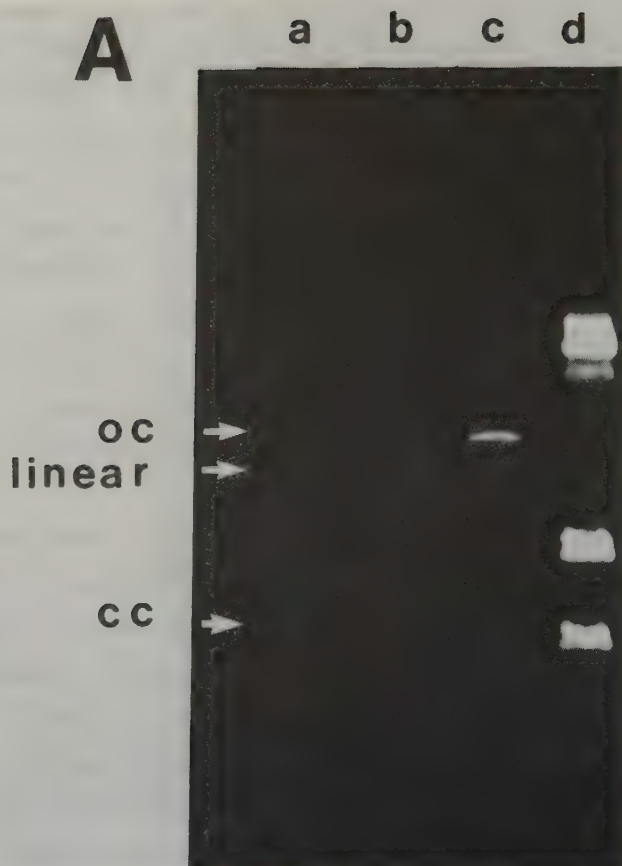


Abb.24. Heilen von Ddp1, Ddp2 und Ddp3 durch axenisches Wachstum. Es wurden Plasmid-Präparationen (s. 6.11.1) von X2, HU32 und HU978 nach unterschiedlich langer Passage in axenischer Kultur durchgeführt.

Abb.24A. a) X2, b) HU32, c) HU978 und d) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA.

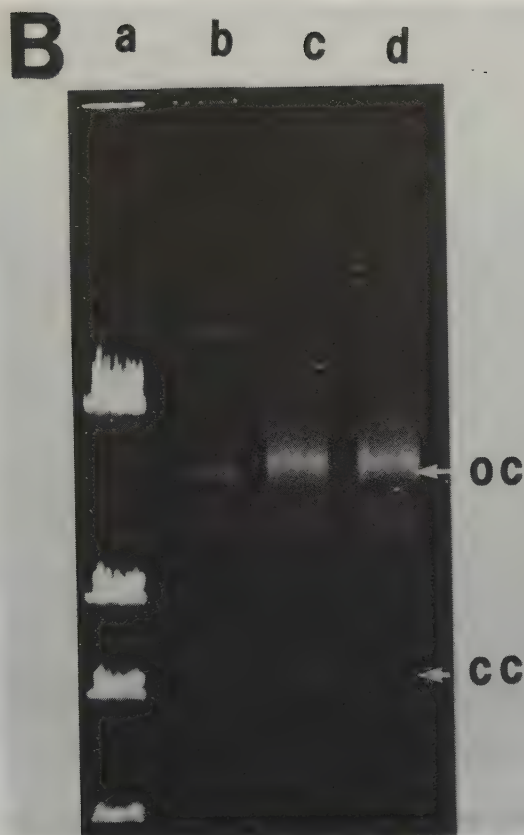


Abb.24B. a) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA, b) X2, c) HU32, d) HU978.

Es wurde jeweils das Äquivalent zu $\sim 6 \cdot 10^7$ axenisch angezogenen Zellen aufgetragen (isoliert nach Birnboim & Doly, 1979; mit Spermin gefällt nach Hoopes & McClure, 1981. Zwischen den Präparationen in A + B liegen etwa 40 Generationen in axenischem Medium, welche im Falle von HU978 (Bc) zum Verlust von Ddp1 führten.



Abb.25A. Nachweis von Plasmid in verschiedenen Stämmen, die über einen längeren Zeitraum auf festem (bakt), bzw. in bakterienfreier Flüssigkultur (axenisch = ax) gehalten wurden. Plasmidpräparationen wurden nach Birnboim & Doly, 1979 durchgeführt.

Es wurde das Äquivalent zu 5×10^7 Zellen aufgetragen. Lediglich in HU32 (bakt.) wurde von weniger Zellen ($< 2 \times 10^7$) ausgegangen.

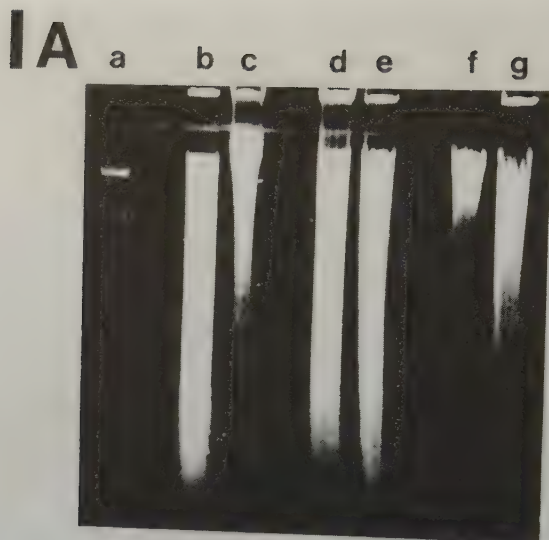
a) HU1565-bakt, b) HU978-bakt, c) HU978-ax, d) HU32-bakt, e) HU32-ax, f) HU1482-bakt, g) X2-bakt, h) AX3-bakt, i) AX3-ax, j) Ohio-bakt, k) NC4-bakt, l) HU1231-ax, m) V12-bakt., n) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA.

Plasmid war nachweisbar in d, e, k und m. In Aj ist das Plasmid des Wildtypstammes Ohio sichtbar. Es ist größer als Ddp1 und besitzt keine Homologien zu Ddp1 (s. Bj und Diskussion).

B a b c d e f g h i j k l m n



Abb.25B. Die Southern blot-Analyse - unter Verwendung von Ddp1 als Probe - bestätigt zusätzlich die Anwesenheit von Plasmid und zeigt, daß auch in der bakteriellen Präparation, in der bedeutend weniger Zellen aufgetragen wurden, Ddp1 vorhanden ist. Die Intensität der Hybridisierung läßt auf ähnliche Kopienzahl in HU32, NC4 und V12 schließen.



B a b c d e f g

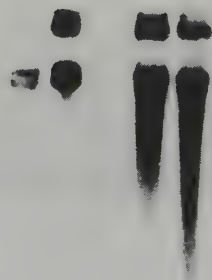


Abb.26. In situ-Lyse-Gele (Eckhardt, 1978; s.6.11.3). A zeigt jeweils das Gel und B die dazugehörige Southern blot-Analyse unter Verwendung von Ddp1 als Probe. Es wurden axenisch (ax) und auf festem Medium (bakt.) angezogene Zellen verwendet. Da unterschiedliche Mengen an Zellen aufgetragen wurden, ist die jeweilige Zellzahl angegeben.

Abb.26I. a) HindIII-geschnittene λ -Phagen-DNA, b) HU32-bakt $<2 \times 10^7$ Zellen, c) HU32-ax 7.5×10^7 , d) NC4-bakt 5×10^7 , e) V12-bakt 5×10^7 , f) HU1231-ax 5×10^7 , g) X2-bakt 6×10^7 .

II A a b c d e f g h i



B a b c d e f g h i



Abb. 26 II. a) V12-bakt 5×10^7 , b) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA, c) HU978-bakt 4×10^7 , d) HU978-ax 5×10^7 , e) Ohio-bakt 7×10^7 , f) AX3-ax 7×10^7 , g) AX3-bakt 8×10^7 , h) HU1482-bakt 4.5×10^7 , i) HU1565-bakt 7×10^7 .

In verschiedenen anderen Wildtypstämmen konnte kein mit Ddp1 vergleichbares Plasmid nachgewiesen werden. So gab es in DNA-Präparationen aus den etwas cobaltresistenten Wildtypstämmen WS526 und WS584 (Robson & Williams, 1980) keinen Hinweis auf Plasmid-DNA (s. Abb.27). Auch in einer Southern blot-Analyse unter Verwendung von Ddp1 als Probe konnte dieses Plasmid in diesen Stämmen nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden von Welker et al., (in Vorber.) durch Untersuchungen an etwa 25 weiteren Wildtypstämmen bestätigt. In einigen anderen Wildtypstämmen wurden jedoch Plasmide in hoher Kopienzahl gefunden, die sich sowohl in der Größe von Ddp1 unterscheiden, als auch keine Homologie zu Ddp1 aufweisen (Welker et al., in Vorber.; s. auch Abb.26). Dieser Punkt wird in der Diskussion ausführlicher behandelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß nicht alle Wildtypstämme Plasmid enthalten, aber die Wildtypstämme NC4 und V12 enthalten Plasmid-DNA, die eine sehr hohe Ähnlichkeit mit Ddp1 aufweist und in ähnlicher hoher Kopienzahl wie Ddp1 in HU32 vorhanden ist. Die Ergebnisse zeigen, daß HU32 der einzige Stamm ist, der in axenischen Medium - jedoch unter selektiven Bedingungen (in Gegenwart von CoCl_2) - sein Plasmid behält. HU32 kann aber unter nicht selektiven Bedingungen sowohl auf festem Medium als auch in axenischer Kultur von Ddp1 geheilt werden, wogegen die Wildtypstämme NC4 und V12, die nicht axenisch angezogen werden können, auch nach einer Passage von mehreren Monaten auf festem Medium, Ddp2 bzw. Ddp3 in unverändert hoher

Kopienzahl enthalten (s. Abb.25 und 26). Dies zeigt, daß die Selektion auf axenische Mutanten zum Verlust der Plasmide Ddp2 und Ddp3 führt. Besonders deutlich wird dies in Abb.18, in der die axenische Mutante von V12, der Stamm HU1231 noch nicht völlig von Ddp3 geheilt ist; die Kopienzahl liegt jedoch unter einer Kopie pro drei Zellen.

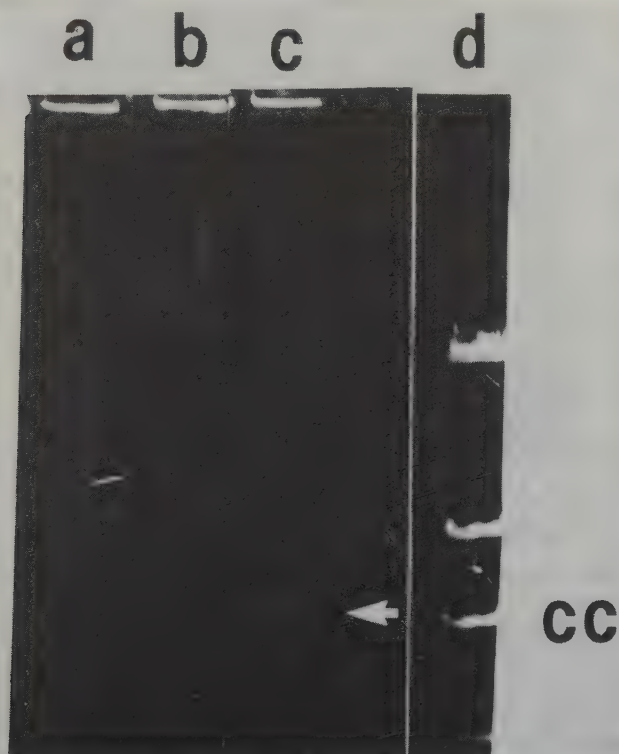


Abb.27. Plasmidpräparationen an verschiedenen D.discoideum-Wildtypstämmen (modifiziert nach Birnboim & Doly, 1979). Als Kontrolle wurde eine Plasmidpräparation an HU32 durchgeführt. Es wurde jeweils das Äquivalent zu $\sim 4-5 \times 10^7$ Zellen/Spur aufgetragen. a) WS584, b) WS526, c) HU32 und d) HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA.

4.5 Plasmidspezifische Transkripte

Um weitere Hinweise auf die Funktion des endogenen Plasmids Ddp1 aus D.discoideum Stamm HU32 zu erhalten, wurde die Regulation von Ddp1 auf der Ebene der Transkription untersucht.

Aus mehreren axenisch angezogenen Stämmen wurde Gesamt-RNA isoliert. Außer HU32, der immer in Gegenwart von $150\mu\text{g/ml}$ $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ angezogen wird, ist der Stamm HU1180, der eine chromosomale Cobaltresistenz (cobA) besitzt, ebenfalls in Gegenwart dieser Konzentration CoCl_2 angezogen worden, aber auch ohne Zusatz von CoCl_2 . HU32 ist der einzige unter den in Abb.28 untersuchten Stämmen, der Plasmid-DNA enthält, wie in parallelen Plasmidpräparationen gezeigt wurde (s.Abb.25 und Abb.26). Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde auf Nitrozellulose übertragen, und der Northern blot - unter Verwendung von Ddp1 als Probe - analysiert (s.Abb.28). Alle Stämme weisen ein ähnliches Hybridisierungsmuster auf. In HU32 sind jedoch insgesamt vier Banden stärker ausgeprägt als in den anderen axenischen Stämmen. Die 2.8kb RNA-Bande ist diejenige, die am stärksten mit Ddp1 hybridisiert, was auf ein häufigeres Vorkommen dieses Transkripts schließen läßt. Die drei weiteren Banden haben ein Molekulargewicht von etwa 1.8, 1.5 und 1.1kb (s.Abb.28).



Abb.28. Northern blot-Analyse von Gesamt-RNA aus verschiedenen axenisch angezogenen Stämmen. Es wurden jeweils $10\mu\text{g}$ RNA, isoliert aus ganzen Zellen, aufgetragen. a) AX3, b) X2, c) HU1482, d) HU32, e) HU978-1, f) HU978-2, g) HU1180, h) HU1180 in Gegenwart von $150\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 angezogen und i) HU1231. Die in HU32 stärker ausgeprägten Transkripte sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Sie haben folgende Größen: 2.8, 1.8, 1.5 und 1.1kb. Die beiden HU978 unterscheiden sich durch unterschiedlich lange Passage in axenischem Medium.

Weiterhin wurde Gesamt-RNA aus den Wildtypstämmen NC4 und V12, die die Plasmide Ddp2 bzw. Ddp3 enthalten, isoliert. (Zu dem Zeitpunkt an dem die Untersuchungen durchgeführt wurden, konnte NC4 noch nicht in bakterienfreier Flüssigkultur angezogen werden; s. jedoch 2.2 und Maeda, 1983.) Die RNA wurde aus vegetativen Zellen (von festem Medium) und aus Zellen in Entwicklung (feste Aggregate in PBS-Schüttelkultur) isoliert. Von HU32 wurde nur RNA aus vegetativen Zellen (axenisch, bzw. auf festem Medium angezogen) untersucht. Die Northern blot-Analyse der Gesamt-RNAs wurde unter Verwendung von Ddp1, pBMW9 und pBMW1 als Probe durchgeführt (s. Abb.29; vgl. Tab.VI).

Bei Verwendung von Ddp1 als Probe, zeigte sich ein sehr komplexes Bandenmuster (s. Abb.29A). In HU32 sind wieder die vier häufigeren Transkripte und insbesondere das 2.8kb Transkript zu sehen (vgl. Abb.28). Bei Verwendung des 800bp-BglII-Fragmentes von Ddp1 als Probe war eine spezifische Hybridisierung mit der sehr häufigen 2.8kb-RNA in vegetativem HU32 (aus axenisch und mit Bakterien angezogenen Zellen) zu verzeichnen. Dieses Ddp1-spezifische Transkript konnte auch in V12- und NC4-RNA, isoliert aus Zellen in Entwicklung (PBS-Schüttelkultur; s. Abb.29B, b und f) nachgewiesen werden, jedoch nicht in vegetativen Zellen (s. Abb.29B, a und e). Mit dem 13kbp-BglII-Fragment von Ddp1 (s. Abb.29C) tritt prinzipiell ein ähnlich komplexes Bandenmuster wie mit Ddp1 auf; jedoch ist die Intensität der Hybridisierung - insbesondere zu der 2.8kb-Bande - verglichen mit Ddp1 als Probe (s. Abb.29A), stark reduziert.

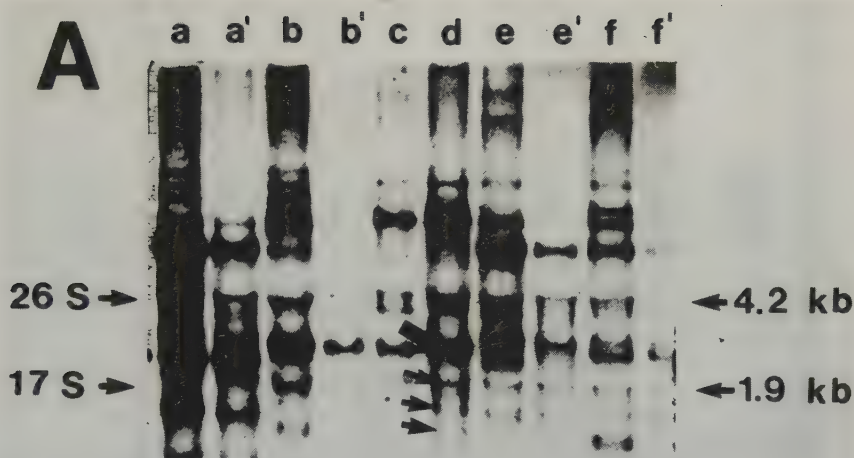


Abb.29. Northern blot-Analyse von Gesamt-RNA aus V12, NC4 und HU32.

Es wurde 10 µg/ml Gesamt-RNA aufgetragen. Die RNA wurde aus ganzen Zellen bzw. cytoplasmatischem Überstand isoliert. Die "cytoplasmatischen" Proben sind mit ' gekennzeichnet. RNA folgender Stämme wurde untersucht: a) V12 (vegetativ, von festem Medium), b) V12 (in Entwicklung, aus PBS-Schüttelkultur), c) HU32 (vegetativ, von festem Medium), d) HU32 (vegetativ, aus axenischer Kultur), e) NC4 (vegetativ, von festem Medium) und f) NC4 (in Entwicklung, aus PBS-Schüttelkultur).

Methodische Details sind 6.6 und 6.14 zu entnehmen. Der für die Northern blot verwendete Nitrozellulosefilter wurde - nach Abschmelzen der jeweiligen Probe - wiederverwendet. Als Probe wurde in A) Ddp1 aus pBMW3, in B) pBMW9 und in C) pBMW1 verwendet. In B) und C) wurden die pBR322-Sequenzen durch Vorhybridisierung abgesättigt (s. 6.10.4).

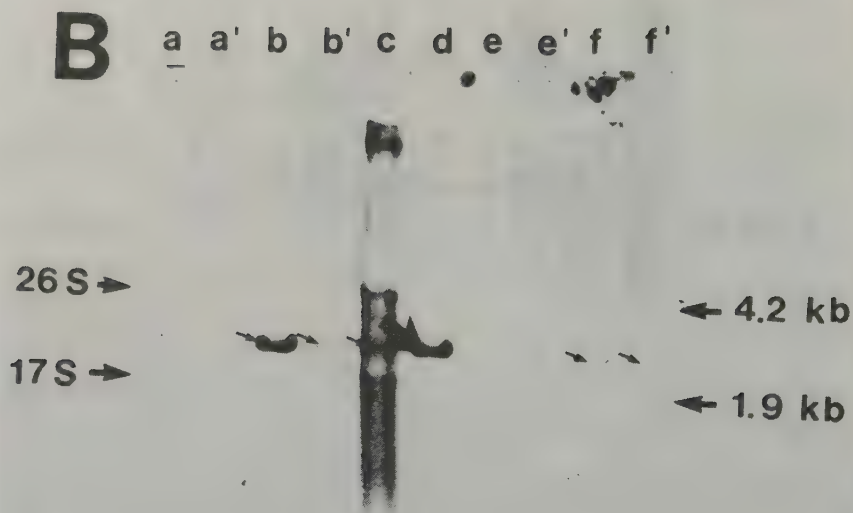


Abb. 29B.



Abb. 29C.

4.6 Verwendung von Ddp1 in einem Transformationssystem

Um Genexpression in D.discoideum untersuchen zu können, ist es notwendig, DNA wieder in den Organismus einführen zu können. Deshalb bietet sich Ddp1 als "Transformationsvektor" an. Bei den bisher durchgeführten Versuchen wurde über die Cobaltresistenz selektioniert.

Da der genetische Hintergrund der Stämme einen Effekt auf das Erhaltenbleiben des Plasmids in dem Organismus haben könnte, wurden verschiedene Stämme zur Transformation verwendet. Weiterhin könnte es von Bedeutung sein, ob der Rezipient bereits endogenes Plasmid enthält; deshalb wurde HU32 selbst verwendet. Weiterhin wurden AX3 und die davon abstammende temperatursensitive Mutante HU1048 (Stämme in denen nie endogenes Plasmid nachgewiesen wurde) und HU913, ein Stamm, der über eine rad-Mutation (UV-Sensitivitätsmutation) verfügt und sich durch eine extrem niedrige Mutationsfrequenz auszeichnet, untersucht.

In Tab.VIII ist ein Transformationsexperiment zusammengefaßt; als Methode wurde eine Modifikation der Methode von Hirth et al., 1982 verwendet. Diese Versuchsanordnung ermöglicht die Variation verschiedener Parameter zur Optimierung des Systems. In dem aufgeführten Beispiel wurde als transformierende DNA pBMW3 und pBMW4, als Rezipientenstämme AX3, HU978 und HU913 verwendet unter Selektion auf Cobaltresistenz. Die Frequenz cobaltresistenter Kolonien lag bei mit Plamid-DNA behandelten Zellen maximal um den Faktor 2 höher als in der Kontrolle. Zunächst wurde an den möglichen

Tab.VIII. Ergebnisse eines Transformationsexperimentes unter Verwendung der Hybridplasmide pBMW3 und pBMW4 (s. Tab.VI).

	Kontrolle ohne Plasmid	pBMW3	pBMW4
HU978	10^{-6}	6.25×10^{-5}	5.45×10^{-5}
AX3	2.4×10^{-5}	1.5×10^{-5}	1.6×10^{-5}
HU913	$>2 \times 10^{-9}$	$>1.4 \times 10^{-9}$	$>1.7 \times 10^{-9}$

Die Transformation wurde in Gewebekulturplatten in einem Endvolumen von ungefähr 0.5ml folgendermaßen durchgeführt:

Methode der Transformation von D.discoideum
pro Ansatz:

0.4ml 10mM Phosphatpuffer, pH 6.5

25µg Plasmid-DNA

12µg Heringssperma-DNA

30µg Poly-L-Ornithin (MG: 20000; Sigma)

30min Kopräzipitation der DNA mit Poly-L-Ornithin bei 100rpm und 21°C; währenddessen werden die D.discoideum-Zellen geerntet. 0.1ml Zellen (~10⁷) werden zu der präzipitierten DNA zugegeben und 30min bei 100rpm und 21°C geschüttelt; CaCl₂ zu einer Endkonzentration von 50mM zugegeben, und weitere 10min bei den angegebenen Bedingungen geschüttelt. Anschließend werden die Zellen unter Verwendung von Cobalt-SM-Platten zur Selektionierung, und eine geeignete Verdünnung auf SM (zur Bestimmung der Plattierungseffizienz) ausplattiert. Die Kolonienzahl wurde nach ~10 Tage Bebrütung bestimmt und die Frequenz cobaltresistenter Kolonien unter Berücksichtigung der Plattierungseffizienz berechnet. In diesem Versuch gab ein Hintergrundwachstum in AX3, welches stärker als normal ausgeprägt war, und zu einer unerwartet hohen spontanen Mutationsrate führte; in HU978 gab es das erwartete Hintergrundwachstum und die übliche spontane Mutationsfrequenz. HU913 hatte die niedrige Mutationsfrequenz, die für diesen Stamm typisch ist.

Ddp1-Transformanten geprüft, ob sie den Phänotyp der instabilen Cobaltresistenz aufwiesen. Dazu wurden Amöben auf SM und Cobalt-SM durch Verdünnungsstrich kloniert und nach mehreren Passagen auf SM erneut die Cobaltresistenz überprüft. Alle Klone hatten eine stabile Cobaltresistenz, die in einigen Fällen nur ein sehr langsames Wachstum auf

Cobalt-SM erlaubte. Diese Methode erwies sich als sehr zeitaufwendig und stellte keinen eindeutigen Nachweis für Transformation dar.

Eine weitere Möglichkeit, transformierende DNA nachzuweisen bieten "Mini"-Plasmidpräparationen, wie sie in Bakterien durchgeführt werden. Es wurden dabei Modifikationen von der Methode von Birnboim & Doly, (1979), bzw. "Koloniehybridisierung" vergewendet (s.6.11). Die Auftrennung der Plasmid-DNA erfolgte nach der Ethanolfällung direkt über Agarosegelelektrophorese. Eine weitere Möglichkeit stellen in situ-Lyse-Gele) dar (s. 6.11.; s.Abb.26).

Bei der Auswahl der Rezipienten wurden auch Stämme genommen, die schon endogenes Plasmid enthielten, wie z.B. bestimmte Versionen von HU978 (s.Abb.30). Es muß damit eine Möglichkeit geben, zwischen diesen beiden Plasmid-Species zu unterscheiden. Bei Verwendung von kloniertem Plasmid (pBMW3 oder pBMW4) zur Transformation kann ein eindeutiger Nachweis der Transformation über pBR322-Sequenzen erfolgen. Da die möglichen Transformanten nicht in bakterienfreier Kultur angezogen wurden, enthielten die Plasmidpräparationen das K.aerogenes-Plasmid pTW16 (s. auch Neuberger & Hartley, 1980); die "Kontamination" mit pTW16 in D.discoideum-Plasmidpräparationen konnte auch durch extensives Waschen nur geringfügig verbessert werden (s. 6.6.5). Abb.30 zeigt Plasmidpräparationen, die an möglichen Transformanten durchgeführt wurden. Die Transformation wurde analog zu dem in Tab.VIII zusammengefaßten Transformationsprotokoll nach Hirth et al., (1982) durchgeführt. Unter Verwendung von

pBR322 als Probe in einer Southern blot-Analyse konnte in diesen möglichen Transformanten nur pTW16 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Koloniehybridisierung kann nicht analog zu Bakterien durchgeführt werden, da D.discoideum, bezogen auf das Volumen nicht genügend DNA enthält, bzw. die DNA durch Kontamination mit anderen Zellbestandteile für eine Hybridisierung nicht zur Verfügung steht. In Rekonstruktionsexperimenten mit nicht gereinigten Zell-Lysaten, die mittels eines "dot blotters" auf Nitrozellulose aufgebracht wurden, wurde die Verfügbarkeit von Ddp1 nachgewiesen. Es wurde HU32 verwendet, oder ein plasmidfreier Stamm unter Zugabe verschiedener Konzentrationen Ddp1. Unter Verwendung von Ddp1 als Probe konnte in HU32, bzw. bei Zugabe von ungefähr 200 Kopien/Zelle eine schwache Hybridisierung nachgewiesen werden. Auch bei der "Koloniehybridisierungs-methode, die für D.discoideum erarbeitet wurde (s. 6.11.2; Daten nicht gezeigt), und der in situ-Gel-Lyse (vgl. Abb.26) ist transformierende DNA auf der Einzelkopienebene nicht unbedingt nachweisbar.

Zusammenfassend sei festgestellt, daß bisher keine eindeutige Aussage über den Erfolg der Transformation unter Verwendung der Cobaltselektion zu treffen ist. Die Frequenz cobaltresistenter Kolonien liegt bei Behandlung mit Ddp1, pBMW3 und pBMW4 um etwa den Faktor 2 höher als in der Kontrolle, wobei es bisher nicht möglich war, die Anwesenheit von transformierender Plasmid-DNA eindeutig nachzuweisen. In unserem Labor wurden die verschiedensten



Abb.30. Plasmidpräparationen (modifiziert nach Birnboim & Doly, 1979) mit möglicherweise transformierten D.discoide-um-Klonen. Die Transformation wurde in Analogie zu der in Tab.VIII zusammengefaßten Methode (Hirth et al., 1982) durchgeführt. Es wurden die Plasmide Ddp1, pBMW1 und pBMW2 verwendet. In c-m wurde jeweils das Äquivalent zu $5-6 \times 10^7$ Zellen aufgetragen. Der verwendete HU978 enthielt zu diesem Zeitpunkt noch endogenes Plasmid. c+d sind unbehandelte Kontrollpräparationen, in denen die hohe Kopienzahl von Ddp2 bzw. Ddp3 sichtbar ist.

a) EcoRI-geschnittene AX3-Gesamt-DNA; b) HindIII-geschnittene λ -Phagen-DNA; c) NC4 Kontrolle. d) V12 Kontrolle. e) HU1048-pBMW2. f) HU1048-pBMW1. g) HU1048-Ddp1. h) HU1048-Ddp1. i) HU1048-pBMW2. j) HU1048-pBMW2. k) HU1048-pBMW2. l) HU978-pBMW2. m) HU978-pBMW1.

Transformationsprotokolle geprüft und modifiziert (Williams, Welker & Noegel. pers. Mitt.), und es wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Darauf wird in der Diskussion ausführlicher eingegangen.

5 Diskussion

Da bisher, mit Ausnahme des 2µm-Plasmids aus Hefe, nur wenige Plasmide im Zellkern von Eukaryonten nachgewiesen werden konnten, war es überraschend, solche Plasmide aus D.discoideum zu isolieren.

5.1 Dictyostelium discoideum-Plasmide

Es mußte zuerst eine Methode entwickelt werden, die die routinemäßige Plasmidisolierung aus D.discoideum ermöglichte, wobei die besonderen Probleme der der DNA- und Plasmidisolierung aus dem niedrigen Eukaryonten D.discoideum (niedriger DNA-Gehalt - bezogen auf das Zellvolumen - und hoher Gehalt an Endonukleasen) berücksichtigt werden mußten (s. Wiener & Ashworth, 1970).

Eine Modifikation der Methode von Birnboim & Doly (1979) erwies sich als geeignet, wobei die Zellen vor der Lyse in einem Puffer aufgenommen wurden, der mit Diethylpyrocarbonat zur Inaktivierung der lytischen Enzyme gesättigt war. Aus D.discoideum können ohne Schwierigkeiten Zellkerne isoliert werden (Charlesworth & Parish, 1975). Da die bisher bekannten D.discoideum-Plasmide in Zellkern lokalisiert sind, stellt dies einen wichtigen Reinigungsschritt dar. Nachdem jetzt die grundlegenden Charakteristika der D.discoideum-Plasmide Ddp1 (aus HU32), Ddp2 (aus NC4) und Ddp3 (aus V12) bekannt sind (z.B. Lokalisation im Kern, hohe Kopienzahl, der für D.discoideum typische, hohe AT-Gehalt), konnten in der Zwischenzeit vier weitere Plasmide aus ungefähr 25 untersuchten Wildtypstämmen von D.discoideum

isoliert werden - z.B. Ddp4 (Größe: ~6kbp, aus dem Stamm WS380B) und Ddp5 (Größe: ~20kbp, aus dem Stamm Ohio), (Welker et al., in Vorber.). Diese Plasmide wurden im Zusammenhang mit Untersuchungen zu dem Polymorphismus der rDNA in Wildtypstämmen als zusätzliche Banden zwischen den ribosomalen Fragmenten gefunden (Welker et al., in Vorber.). Die Plasmide Ddp4 und Ddp5 weisen damit die oben erwähnten Charakteristika von Ddp1 - wie Lokalisation im Zellkern und hohe Kopienzahl - auf. Ddp4 und Ddp5 unterscheiden sich aber von Ddp1 in Größe und Restriktionsmuster; weiterhin bestehen keine Homologien zwischen Ddp1 und Ddp4 bzw. Ddp5, sowie zwischen den Plasmiden Ddp4 und Ddp5 untereinander, wie über Southern blot-Analyse nachgewiesen wurde (Welker et al., in Vorber.). Interessanterweise konnten diese Plasmide bisher jeweils nur in einem Wildtypstamm nachgewiesen werden. Ddp1 und die sehr ähnlichen Plasmide Ddp2 und Ddp3 sind damit nicht die einzigen Beispiele für Plasmid-DNA in D.discoideum. Andererseits sind Plasmide auch nicht in jedem Wildtypstamm - in hoher Kopienzahl - zu finden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß Plasmid-DNA irgendwelcher Form in niedriger Kopienzahl enthalten sein könnte.

Im Fall von Ddp2 (aus von NC4 abstammenden Stämmen) und Ddp3 (aus von V12 abstammenden Stämmen) ist es jedoch bemerkenswert, daß mehr oder weniger identische Plasmide in geographisch isolierten Wildtypstämmen nachgewiesen werden konnten.

5.2 Dictyostelium discoideum-Plasmide: Vergleich mit anderen eukaryontischen Plasmiden

Bisher sind nur wenige Plasmide in Eukaryonten nachgewiesen worden, wobei ihre Zahl in den letzten Jahren sprunghaft angestiegen ist (Tudzynski, 1982). Prinzipiell lassen sich in Abhängigkeit von der Lokalisierung zwei Klassen unterscheiden: Plasmide, die im Zellkern bzw. in den Mitochondrien lokalisiert sind. Weiterhin kann man zwischen Plasmiden unterscheiden, die in Analogie zu prokaryontischen Plasmiden keine Homologie zu dem Genom haben, und solchen, die große Homologien aufweisen und mehr oder weniger direkt aus dem Genom entstanden sind (Tudzynski, 1982; Esser et al., 1983).

5.2.1 Nukleare Plasmide

Das bekannteste und wohl am besten charakterisierte Beispiel ist das 2 μ m-Plasmid aus S.cerevisiae (Broach, 1981; Cameron et al., 1977), welches etwa halb so groß ist wie Ddp1 und durch zwei invertierte Sequenzen in zwei etwa gleichgroße Bereiche unterteilt wird. Der Replikationsursprung ist in der Nähe einer solchen Sequenz lokalisiert. Das Plasmid liegt in hoher Kopienzahl vor (~60/Zelle). Eine chromosomale Kopie des 2 μ m-Plasmids konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Cameron et al., 1977). In dem D.discoideum-Genom konnte bisher ebenfalls keine ins Genom integrierte Kopie von Ddp1 nachgewiesen werden. In D.discoideum wurden die Versuche mit Gesamt-DNA aus plasmidfreien Stämmen durchgeführt, da der Nachweis einer einzelnen Kopie in HU32, bedingt durch die

hohe Kopienzahl von Ddp1 nicht möglich war. Durch das Fehlen einer chromosomalen Kopie ist Ddp1 mit einem prokaryontischen Plasmid vergleichbar.

Die Replikation des 2 μ m-Plasmids ist eng an den Zellzyklus gebunden. Das Plasmid codiert keine Komponenten, die für die Zelle essentiell sind (Cameron et al., 1977; Broach, 1981). Bekannt sind jedoch solche, die für die Erhaltung des Plasmids, bzw. der hohen Kopienzahl notwendig sind; in bestimmten Fällen ist damit eine vom Zellzyklus relativ unabhängige Regulation verbunden (Jayaram et al., 1983). In beiden Organismen sind - wie auch in Bakterien (Sherratt, 1982) - die endogenen Plasmide nicht essentiell.

Von S.cerevisiae gibt es nur wenige Wildtypstämme, die kein 2 μ m-Plasmid enthalten (Cameron et al., 1977), wogegen sich in 22 aus etwa 25 untersuchten D.discoideum-Stämmen kein im Zellkern lokalisiertes, endogenes Plasmid in hoher Kopienzahl nachweisen läßt. In D.discoideum scheint es die Ausnahme zu sein, daß mehr oder weniger identische Plasmide in verschiedenen Wildtypstämmen vorkommen. Deshalb soll in diesem Zusammenhang noch bemerkt werden, daß zu dem Zeitpunkt der Isolierung von NC4 und V12 noch keine Methoden der Konservierung von D.discoideum bekannt waren. Die beiden Stämme wurden ungefähr fünf Jahre auf festem Medium kultiviert, bevor Sporen erstmals auf Silicagel konserviert wurden. Darauf könnte die spekulative Vermutung basieren, daß es zu einer Übertragung von Plasmid-DNA zwischen den beiden Wildtypstämmen gekommen sein könnte.

S.cerevisiae kann durch Transformation und zunächst

selektive Anzucht von $2\mu\text{m}$ -DNA geheilt werden: die daran anschließende Anzucht unter nicht selektiven Bedingungen resultiert in plasmidfreien Stämmen (Erhart & Hollenberg, 1982). Über die Selektion auf axenisches Wachstum können in D.discoideum Stämme von den endogenen Plasmiden Ddp2 und Ddp3 geheilt werden. HU32 kann dagegen - unter nicht selektiven Bedingungen (ohne CoCl_2) - sowohl auf festem Medium und als auch in axenischer Kultur von Ddp1 geheilt werden.

Über Southern blot-Analyse wurde nachgewiesen, daß Ddp1 keine Homologie zu dem $2\mu\text{m}$ -Plasmid hat (Daten nicht gezeigt). Ddp1 hat jedoch viele Gemeinsamkeiten mit dem $2\mu\text{m}$ -Plasmid (Lokalisation, hohe Kopienzahl, keine essentiellen Funktionen, und Stämme können von Plasmid geheilt werden).

Im Zusammenhang mit nuklearen Plasmiden soll noch die extrachromosomal vorliegende rDNA niedriger Eukaryonten erwähnt werden, die häufig in Form linearer Palindrome vorliegt (Vogt & Braun, 1976 & 1977; Blackburn & Gall, 1978; Cockburn et al., 1978); in verschiedenen Hefen scheint die rDNA, zusätzlich zu den chromosomalen Kopien, in niedriger Kopienzahl auch extrachromosomal als circuläres Molekül mit einer Größe von $3\mu\text{m}$ vorzuliegen (Clark-Walker & Azad, 1980; Larionov et al., 1980; Anziano et al., 1983). Im Falle der extrachromosomalen Palindrome läßt sich in P.polycephalum und D.discoideum keine "master copy" im Genom nachweisen.

Bei den weiteren, bisher bekannten eukaryontischen

Plasmiden, die im Nukleus lokalisiert sind, handelt es sich hauptsächlich um Elemente, wie z.B. *copia* in Drosophila. *Copia* scheint als circuläres DNA-Molekül nur als Übergangsform während der Transposition vorzuliegen (Flavell & Ish-Horowicz, 1981), und unterscheidet sich grundlegend von D.discoideum, da es mehrere integrierte Kopien gibt, und circuläre Kopien nur mit einer Häufigkeit von ungefähr einer Kopie/50 Zellen nachzuweisen sind (Flavell & Ish-Horowicz, 1981). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß auf *copia* basierende Transformationsvektoren nicht ins Genom integrieren, sondern extrachromosomal in - für *copia* - hoher Kopienzahl (etwa eine Kopie pro Zelle) in den transformierten Zellen beibehalten werden (Sinclair et al., 1983).

Ein weiteres Beispiel sind in Gewebekulturzellen mit Alu-Sequenzen assoziierte, circuläre Elemente; ihre Funktion ist unbekannt (Calabretta et al., 1982).

Es sollen noch kurz Plasmide erwähnt werden, die Besonderheiten in der Lokalisation oder in ihren Wirtsverhalten haben.

So konnte in dem Pilz Fusarium oxysporum ein Plasmid nachgewiesen werden, das nicht nuklear lokalisiert ist; der Verlust des Plasmids ist korreliert mit dem Verlust der Nitrofurant-Resistenz (Guardiola et al., 1982).

Unsere anfängliche Arbeitshypothese, daß die instabile Cobaltresistenz, bzw. das Plasmid Ddp1 in HU32, bakteriellen Ursprungs sein könnte - insbesondere da ein cobaltresistenter K.aerogenes-Stamm zur routinemäßigen Anzucht von

D.discoideum verwendet wird - erwies sich als falsch. Es konnte keine Homologie zu dem aus diesem K.aerogenes-Stamm isolierten Plasmid pTW16 (Li et al., in Vorber.) oder zu chromosomaler K.aerogenes-DNA nachgewiesen werden. Weiterhin gibt es Systeme, in denen es zum Austausch von DNA zwischen einem prokaryontischen und eukaryontischen System, bzw. umgekehrt kommt. Das TI-Plasmid aus Agrobacterium tumefaciens stellt einen solchen Fall dar; es hat die besondere Eigenschaft, daß ein bestimmter Teil des bakteriellen Plasmids in das eukaryontische Wirtsgenom integriert wird und dort als Oncogen wirkt (Bevan & Chilton, 1982). Ein Beispiel für den umgekehrten Fall ist der Austausch des Gens für das Enzym Superoxid-Dismutase aus dem Ponyfisch in das symbiontische Bakterium Photobacter leioqnaethi (Lewin, 1982).

5.2.2 Mitochondrielle Plasmide

In der Klasse der mitochondriellen Plasmide gibt es inzwischen schon recht viele Beispiele. Für die D.discoideum-Plasmide konnte dagegen gezeigt werden, daß sie im Nukleus lokalisiert sind, und auch keine Homologien zu der mtDNA aufweisen. Die mitochondriellen Plasmide sind hauptsächlich in niedrigen eukaryontischen Pilzen zu finden, aber auch in einigen Monocotyledonen, wie z.B. Zea mays. Sie liegen in linearer, aber auch circolärer Form vor (Tudzynski, 1982; Esser et al., 1983).

Generell scheinen Mitochondrien-Genome sehr dynamische Strukturen zu sein, welches sich unter anderem in den

Größenunterschieden der mitochondriellen Genome verschiedener Hefen zeigt, die zwischen ungefähr 28 und 100kbp variieren (McArthur & Clark-Walker, 1983). In verschiedenen Hefen gibt es die Petite-Mutanten (ρ^-), wobei in einem Teil dieser Mutanten ein Bruchteil des Genoms amplifiziert vorliegt (ρ^-), bei anderen vollständig fehlt (ρ^0). Der eukaryontische filamentöse Pilz Podospira anserina weist einige Ähnlichkeiten mit diesem Phänomen auf. Es konnten mitochondrielle Plasmide nachgewiesen werden, die während des Alterungsprozesses durch Excision aus dem mitochondriellen Genom entstehen (Kück et al., 1981; Wright & Cummings, 1983). Die Excision von DNA aus dem mt-Genom könnte als Modell für die Entstehung von Plasmiden betrachtet werden. Es gibt jedoch auch mitochondrielle Plasmide, die keine Homologien zu dem mitochondriellen Genom aufweisen, z.B. in Claviceps purpurea (Tudzynski et al., 1983) und Neurospora crassa (Stohl et al., 1982). Plasmide in höheren Pflanzen liegen in linearer und circulärer Form vor. Durch die Integration bestimmter linearer Plasmide wird die Fertilität in Zea mays wieder hergestellt. Weiterhin ist interessant, daß Homologien zwischen der Plasmid-DNA aus Claviceps purpurea und den der Plasmid-DNA der Getreidearten, die befallen werden, bestehen (Tudzynski et al., 1983).

5.3 Funktion der D.discoideum-Plasmide unter besonderer Berücksichtigung von Ddp1 und seiner Assoziation mit der instabilen Cobaltresistenz (cob-354)

In den bisher näher charakterisierten, eukaryontischen Plasmiden konnten keine offensichtlichen Funktionen, wie

z.B. Schwermetall- oder Antibiotikaresistenz nachgewiesen werden (Struhl, 1983; Tudzynski, 1982; Esser, 1983). Das in dieser Arbeit charakterisierte D.discoideum-Plasmid Ddp1 wurde durch seine Assoziation mit einer instabilen Cobaltresistenz in dem Stamm HU32 entdeckt, die sich nicht dem bisher einzigen bekannten Cobaltresistenz-Locus zuordnen ließ.

5.3.1 Chromosomale Cobaltresistenz in Dictyostelium discoideum

Zum besseren Verständnis der Besonderheiten der instabilen Cobaltresistenz (cob-354) in D.discoideum, wird hier auf die chromosomale Cobaltresistenz in D.discoideum eingegangen. Auf festem Medium (in Gegenwart von Bakterien) ist eine Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 für Wildtypstämme nicht toxisch (Williams, 1978). Bisher gibt es einen einzigen bekannten Cobaltresistenzlocus (cobA), der auf Kopplungsgruppe VII liegt und zum Wachstum auf festem Medium in Gegenwart von $300\mu\text{g/ml}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.26mM CoCl_2) befähigt. Die Mutationsfrequenz (bestimmt durch Ausplattieren auf selektivem Medium) liegt bei ungefähr 10^{-6} (Welker & Williams, 1980a). Die cobA-Mutation hat gegenüber dem Wildtyp eine leichte Dominanz und ist, wie andere chromosomale Marker, stabil (Williams, 1978).

In Stämmen mit einer chromosomalen Cobaltresistenz-Mutation, aber auch in Stämmen mit der instabilen cob-354-Mutation, wird ein braunes Pigment gebildet. Eine wahrscheinlich davon unabhängige Mutation, der Farbmaker bwnA, ist auf

Kopplungsgruppe IV lokalisiert. Die Bildung des braunen Melanin-ähnlichen Pigments ist verursacht durch die verminderte Aktivität der Homogentisinsäure-Oxidase (Morrissey, 1983). Die Suppressionsmutante supA1 auf Kopplungsgruppe II unterdrückt den Phänotyp der Cobaltresistenz und der damit verbundenen Bildung von braunem Pigment, sowie die bwnA1-Mutation auf IV (Welker & Williams, 1982a). Der Mechanismus der Suppression ist unbekannt.

Die Bildung von braunem Pigment wurde ebenfalls in cobaltresistenten Hefe-Stämmen beobachtet (Pellecuer et al., 1971). Beim Untersuchen cobaltresistenter Mutanten gab es sowohl weiße, als auch braune Kolonien, welche in Abwesenheit von Cobalt immer weiß waren.

Der Phänotyp der instabilen cob-354-Mutation in HU32 ist ähnlich dem einer chromosomalen Cobaltresistenz-Mutation. HU32 ist ein Stamm, der in seiner Entwicklung beeinträchtigt ist; er bildet nur wenige, nicht sehr gut entwickelte Fruchtkörper aus (Williams, 1978). Bevor diese Mutation im Detail diskutiert wird, werden mögliche Mechanismen der Cobalt-, bzw. Schwermetallresistenz besprochen.

5.3.2 Mechanismen der Schwermetallresistenz unter besonderer Berücksichtigung der Cobaltresistenz

Über den Mechanismus der Resistenz gegen Cobalt ist bisher nicht viel bekannt.

Prinzipiell lassen sich zwei Möglichkeiten unterscheiden: Die Resistenz kann verursacht sein durch eine aktive Detoxifikation des Cobalts in der Zelle, oder aber durch

einen Mechanismen, der über z.B. Membranveränderungen oder Transportmechanismen zu einer verminderten Aufnahme führt. Generell ist von Cobalt-Ionen bekannt, daß sie verschiedene Effekte auf z.B. die Nukleinsäuren haben (Barton & Lippard, 1980). Bei niedrigen Cobaltkonzentrationen erfolgt die Bindung ausschließlich an die Phosphat-Anionen der DNA, welche eine Erhöhung des Schmelzpunktes bewirkt: bei höheren Konzentrationen wird die helicale Struktur der DNA verändert, was eine Erniedrigung des Schmelzpunktes bewirkt (Barton & Lippard, 1980).

Bisher sind in D.discoideum keine Schwermetall-komplexierenden Proteine nachgewiesen worden. In Amöben von D.discoideum wurde Protoporphyrin nachgewiesen, welches wahrscheinlich eine Rolle in der Photorezeption spielt (Lagarias et al., in Druck). Cobalt ist das Zentralatom in dem biologisch wichtigen Porphyrin-ähnlichen Vitamin B12 (Alberts et al., 1983). Weiterhin ist von Cobalt bekannt, daß es einen inhibierenden Effekt auf die Synthese von Haem-Proteinen in Rattenleber (Sinclair et al., 1979) und in isolierten Hepatocyten (Lodola, 1981) hat, wobei es unter Hemmung der 5-Aminolaevulinat-Synthetase zur Bildung von Cobalt-Protoporphyrin kommt (Sinclair et al., 1979; Lodola, 1981). Von Hefe ist bekannt, daß rho⁻-Mutanten bei anaerobem Wachstum cobaltresistent werden, wobei ein Zusammenhang mit verschiedenen Porphyrin-ähnlichen Strukturen der mitochondriellen Atmungskette bestehen könnte (Bachhofen et al., 1972).

In Prokaryonten sind Mechanismen, die zu verschiedenen

Schwermetallresistenzen führen, besser untersucht: durch Reduktion, Oxidation, Methylierung und Demethylierung werden die betreffenden Metallionen inaktiviert (Summers & Silver, 1978). Für Arsenat- und andere Schwermetallionen konnte ein Plasmid-bedingter energieabhängiger Efflux-Mechanismus nachgewiesen werden. Durch verstärkten Ionentransport aus der Bakterienzelle kommt es zu einer verminderten Nettoaufnahme von z.B. Arsenate (Silver & Keach, 1982; Mobley & Rosen, 1982).

In Eukaryonten gibt es Schwermetall-bindende Proteine, die Metallothioneine (Kägi & Nordberg, 1979). Es handelt sich dabei um kleine Cystein-reiche Proteine, die zur Bindung von Schwermetallen, insbesondere Cd, Zn, Ag und Hg, befähigt sind. Die Effizienz dieses Mechanismus kann durch Genamplifikation und somit durch vermehrte mRNA und Proteinsynthese gesteigert werden; so ist z.B. dieser Mechanismus die Ursache einer Cadmiumresistenz in Mauszellen (Beach & Palmiter, 1981). In Hefe ist Kupferresistenz durch Amplifikation des cup-Genes bedingt (Fogel & Welch, 1982; Fogel et al., 1983), wobei die Kupferresistenz durch die Überproduktion eines Kupfer-bindenden Proteins mit niedrigem Molekulargewicht, dem Kupfer-Chelatin, verursacht wird.

5.3.3 Instabile Cobaltresistenz in Dictyostelium discoideum

An dieser Stelle sollen nochmals die Ergebnisse zusammengefaßt werden, die die Assoziation der cob-354-Mutation mit Ddp1 bekräftigen:

-Die instabile Cobaltresistenz kann nicht chromosomal loka-

lisiert werden.

-Sie geht unter nicht-selektiven Bedingungen verloren und ist von dem Verlust von Ddp1 begleitet, der jedoch nicht immer völlig synchron verläuft.

-Die Anwesenheit der cob-354-Mutation und Ddp1 ist mit Auswirkungen auf zumindest einen weiteren Marker korreliert (Coumarinsensitivität): Die chromosomale couA351-Mutation wird in Gegenwart von Ddp1 und der dominanten Cobaltresistenz nicht exprimiert, jedoch nach dem Heilen.

- Die Anwesenheit von Ddp1 in HU32 hat im Gegensatz zu den sehr ähnlichen Plasmiden Ddp2 und Ddp3 in NC4 bzw. V12 einen Effekt auf die Entwicklungsregulation eines Plasmid-codierten Transkripts.

Es ist unwahrscheinlich, daß die instabile Cobaltresistenz in HU32 und davon abstammenden Stämmen, welche mit dem Plasmid Ddp1 assoziiert ist, über eine Regulation der Kopienzahl erfolgt, da die sehr ähnlichen Plasmide Ddp2 und Ddp3 aus den Wildtypstämmen NC4, bzw. V12, die nicht cobaltresistent sind, in ähnlich hoher Kopienzahl vorliegen. Die Tatsache, daß in Stämmen mit der instabilen Cobaltresistenz und einer couA351-Mutation, dieser Coumarinsensitivitäts-Phänotyp unterdrückt wird, und nach Verlust der instabilen Cobaltresistenz und Ddp1 der cou-Phänotyp wieder exprimiert wird, sprechen für einen Mechanismus, der sich nicht auf Cobalt-Ionen beschränkt, aber mit der Anwesenheit von Ddp1 korreliert ist. Es wird angenommen, daß Coumarinsensitivitäts-Mutanten durch Veränderungen an der Zelloberfläche oder den Mikrotubuli, bzw. Proteinen, die mit den

Mikrotubuli assoziiert sind, verursacht sind (Welker & Williams, 1982b). So runden sich Zellen, die über eine couA351-Mutation verfügen, in Schüttelkultur in Gegenwart von Coumarin ab, wobei sich mehrere Zellen zusammenlagern (Welker & Williams, 1982b).

HU32, bzw. Stämme mit der cob-354-Mutation - unter selektiven Bedingungen angezogen - sind die einzigen Stämme, die aus axenischer Kultur zur Plasmidisolierung verwendet werden können. Wie für mehrere Stämme gezeigt wurde, bewirkt die Selektion axenischer Mutanten, bzw. axenische Anzucht das Heilen von Plasmid. Axenische Mutationen sind bedingt durch Veränderungen der Zellmembran, wodurch die Zellen zur verstärkten Pincytose befähigt sind (North & Williams, 1978; Turner et al., 1979; Vogel et al., 1980).

In Restriktionsenzymverdau und Southern blot-Analyse konnten keine Unterschiede zwischen den Plasmiden Ddp1, Ddp2 und Ddp3 festgestellt werden. Die Auswertung der Daten, die über Northern-Analyse von NC4, V12 und HU32 erhalten wurden, läßt den Schluß zu, daß eine geringfügige Mutation in z.B. der Promoterregion eines entwicklungsregulierten Genes auf Ddp2 (aus NC4), das hauptsächlich von dem 800bp-BglII-Fragment codiert wird, dieses Gen in ein konstitutives Gen in Ddp1 überführt. In vegetativen Zellen von HU32 ist das "800bp-BglII-Transkript" von Ddp1 stark exprimiert. In NC4 und V12 dagegen ist dieses Transkript in vegetativen Zellen (von festem Medium) nicht nachweisbar. Es wird erst in sich entwickelnden Zellen exprimiert. Bei der Transkriptionsanalyse sind noch einige Fragen zu klären. So muß die

entwicklungsregulierte Transkription von Ddp1 im Detail geklärt werden, wobei in einem Zeitversuch verschiedene Entwicklungsstufen untersucht werden müssen. In einem solchen Versuch muß von Zellen ausgegangen werden, die auf Filterpapieren den ganzen Entwicklungszyklus durchlaufen können, da es in PBS-Schüttelkultur nur zur Bildung fester Aggregate kommt. Durch Untersuchungen an PolyA⁺-RNA muß weiterhin geklärt werden, welche und wieviele Transkripte in der Northern blot-Analyse Ddp1-spezifisch sind, und welche durch unspezifische Hybridisierung - mit z.B. ribosomalen RNA-Banden - verursacht sind. Um Unterschiede zwischen den Plasmiden zu finden, bietet es sich an, das 2.8kbp-EcoRI-Fragment von Ddp1, Ddp2 und Ddp3 zu sequenzieren. Dieses Fragment beinhaltet das 800-bp-BglIII-Fragment und die auf beiden Seiten angrenzenden Bereiche.

Falls es sich jedoch herausstellen sollte, daß die hochmolekularen Banden, die in den Northern blots unter Verwendung von Ddp1 als Probe auftreten, nicht durch unspezifische Kreuzhybridisierung verursacht sind, muß ein komplizierteres Modell, welches evtl. ein regulatorisches Protein beinhaltet, für den Mechanismus der Cobaltresistenz aufgestellt werden.

5.4 Transformation in Dictyostelium discoideum: Vektorkonstruktion

Um in dem Modellsystem D. discoideum die Grundlagen der Genregulation, insbesondere während der Entwicklung, besser untersuchen zu können, ist es notwendig, isolierte und

modifizierte Gene wieder in D.discoideum einführen zu können. Dies erfordert ein Transformationssystem, das routinemäßig eingesetzt werden kann, und eine hohe, reproduzierbare Transformationsfrequenz ergibt.

Die bereits entwickelten Transformationsprotokolle (Ratner et al., 1981; Hirth et al., 1982; Barclay & Meller, 1983) lassen sich wegen der großen Schwankungen in der Transformationsfrequenz und nur bedingten Reproduzierbarkeit noch nicht problemlos verwenden. Die Vektoren wurden mit u.a. E.coli- bzw. S.cerevisiae-Sequenzen konstruiert. Es bestehen noch Probleme mit z.B. dem Rückisolieren der transformierenden DNA aus D.discoideum und/oder Schwierigkeiten mit dem selektiven Marker (G418-Resistenz). Weiterhin wird fremde DNA in D.discoideum, bedingt durch den extrem hohen AT-Gehalt, oft umgeordnet (Firtel, pers. Mitt.).

Die ersten Transformationserfolge in D.discoideum wurden von Ratner et al, 1981 erzielt. Dabei wurde D.discoideum-Wildtyp-DNA in einen Hefe-Transformationsvektor kloniert (Stinchcomb et al, 1980) und eine D.discoideum bsq-Mutante zum Wildtyp transformiert. Die transformierende DNA konnte jedoch nicht aus D.discoideum isoliert werden.

In zwei Gruppen wurden selektive Transformationsvektoren konstruiert, die die Resistenz gegen das Gentamicin-Analog G418 tragen.

Der von Hirth et al., 1982 verwendete Vektor enthält den bakteriellen Klonierungsvektor pML2 und die Neomycin-Resistenz des Transposons Tn5; der Tn5-Promoter wurde durch den

Promoter eines Actin-Genes von D.discoideum ersetzt. Weiterhin enthält der Vektor das 3'-Ende des Actin-Genes und eine in Hefe identifizierte autonom replizierende Sequenz (ars) aus D.discoideum, die die Transformationsfrequenz in Hefen stark erhöhte (Stinchcomb et al., 1980).

Von Barclay und Meller (1983) wurde ein ebenfalls auf der Neomycinresistenz basierender Vektor konstruiert. Als Vektor wird das Plasmid pA60, das zur Transformation von Gewebekulturzellen entwickelt wurde, verwendet. Es trägt die Promoterregion der Thymidinkinase des Herpes simplex TypI Virus, gekoppelt an das bakterielle kan-Gen von TN5. Mit dem Vektor allein konnte D.discoideum nicht transformiert werden, jedoch mit D.discoideum-Sequenzen, die in das Tetracyclin-Gen des Vektors kloniert waren. Zur Transformation wurde im Prinzip die bakterielle Ca^{++} -Transformationsmethode verwendet (Mandel & Higa, 1970).

Nachdem sich die beschriebenen Methoden nur bedingt zur Transformation einsetzen ließen, bot sich an, Ddp1 zur Transformation zu verwenden und die Transformanten über Cobaltresistenz zu selektionieren.

Bisher ist es noch nicht gelungen, mit Ddp1 oder den Hybridplasmiden (pBMW1, pBMW2, pBMW3 und pBMW4 mit hoher Frequenz zur Cobaltresistenz zu transformieren. Die Frequenz cobaltresistenter Transformanten unterscheidet sich nur geringfügig von der spontanen Mutationsfrequenz der Kontrolle. Nur in dem Rezipientenstamm HU978 konnte Plasmid nachgewiesen werden, jedoch war zu diesem Zeitpunkt der Stamm noch nicht völlig von Ddp1 geheilt. Es konnte kein

Plasmid in der Größe der klonierten Plasmide nachgewiesen werden. Der Nachweis über pBR322 erwies sich weiterhin als nicht optimal, da sich in Präparationen aus bakteriell angezogenen D.discoideum-Zellen, das K.aerogenes-Plasmid durch eine starke Kreuzhybridisierung mit pBR322 störend bemerkbar macht (s. auch Neuberger & Hartley, 1980).

In weiterführenden Versuchen wurden die oben beschriebenen, sowie auch Hefe- oder E.coli-Transformationsprotokolle (Hinnen et al., 1978; Struhl et al., 1979; Ito et al., 1983; Hanahan, 1983) und der elektrische Feldsprung (Wong & Neumann, 1982) auf ihre Anwendbarkeit für die Transformation von D.discoideum mit Ddp1 geprüft. Bei Transformationsversuchen, die in Analogie zur Hefetransformation durchgeführt wurden, zeigte sich, daß Polyethylenglykol relativ toxisch ist und bei den in Hefe-Transformationen verwendeten Konzentrationen zur Lyse von D.discoideum-Zellen führt (Williams & Welker, nicht veröffentlicht). Bei den anderen Methoden wurden verschiedene Parameter modifiziert, wie z.B. die Konzentration verschiedener Chemikalien, die zur Kopräzipitation der DNA verwendet werden können (Poly-L-Ornithin, Histon, Schwermetalle), wobei immer auf Cobaltresistenz selektioniert wurde (Noegel, Welker & Williams, nicht veröffentlicht). In keinem Fall war eine drastische Steigerung der Cobaltresistenz zu verzeichnen. Bei den Transformationsexperimenten ist nicht geklärt, ob die Mißerfolge der Transformation mit Ddp1 durch Probleme mit dem selektiven Marker, der Cobaltresistenz, verursacht sind. Es könnte auch sein, daß die DNA überhaupt nicht in

die Zelle gelangen konnte, da sie, bevor sie sich etablieren und exprimiert werden konnte, von den ins Medium abgegebenen Nukleasen abgebaut wurde. Dies zeigt die Notwendigkeit der Konstruktion von Vektoren mit einem selektiven Marker, der eine eindeutige Aussage über den Erfolg der Transformation zuläßt. Dieser Punkt wird unten ausführlich behandelt.

Konstruktion von Transformationsvektoren

In S.cerevisiae wurde Transformation erst möglich, als mit Hilfe rekombinanter Gentechnologie Transformationsvektoren mit selektionierbaren Genen, wie z.B. dem Hefe ura3-Gen, konstruiert werden konnten. Damit konnten auxotrophe Mutanten transformiert und die Selektion auf Prototrophie durchgeführt werden (Hinnen et al., 1978).

In D.discoideum sind einige auxotrophe Mutanten isoliert (Franke & Kessin, 1978; Podgorsky, 1983) und die entsprechenden Wildtypgene kloniert worden (Boy-Marcotte & Jacquet, 1982; Jacquet et al., 1982). Eine der isolierten Thymidilat-Synthetase-Mutanten (Podgorski, 1983) hat sogar einen so hohen Bedarf an Substrat, daß sie nicht in normalem axenischen Medium angezogen werden kann (Podgorsky, 1983). Es wurde versucht, aus dem Elternstamm der Thymidilat-Synthetase Mangelmutante das Gen für die Thymidilat-Synthetase (TMPI) in einen S.cerevisiae-E.coli-shuttle-Vektor, analog zur Isolierung des TMPI-Genes von S.cerevisiae durch Komplementierung einer E.coli-Mutante zu isolieren (Taylor et al., 1982). Mit drei, unabhängig von einander isolierten Hybridplasmiden mit D.discoideum-Insertionen ist es möglich,

sowohl E.coli als auch S.cerevisiae zur Prototrophie zu transformieren (Noegel & Podgorsky, in Vorber.). Mit Hilfe des klonierten D.discoideum-TMPI-Genes und der endogenen D.discoideum-Plasmide sollen Transformationsvektoren konstruiert werden, die bessere Möglichkeiten zur Selektionierung von Transformanten bieten als Ddp1 alleine. Die Plasmide Ddp4 und Ddp5 sind noch nicht näher charakterisiert. Der Vorteil des Plasmids Ddp4 aus dem Wildtypstamm WS380B ist die relativ geringe Größe von etwa 5kbp, wodurch die Konstruktion und Handhabung des Vektors erleichtert würde. Da Ddp5 aus dem Wildtypstamm Ohio noch größer als Ddp1 ist, wird es vorerst nicht in die Konstruktion von Transformationsvektoren miteinbezogen werden. Bei der Konstruktion von Vektoren unter Verwendung von Ddp1 lassen sich bisher noch keine größeren Bereiche des Plasmids ausschließen, da es möglich ist, daß Ddp1 Komponenten codiert, die verantwortlich sind für eine Propagation des Plasmids in hoher Kopienzahl, wie es z.B. für das 2 μ m-Plasmid in S.cerevisiae nachgewiesen wurde (Jayaram et al., 1983). Im 2 μ m-Plasmid werden diese Genprodukte von Bereichen codiert, die in relativer Nähe des Replikationsursprungs liegen. In Ddp1 ist der Replikationsursprung noch nicht näher lokalisiert worden.

In S.pombe konnte gezeigt werden, daß unter Verwendung einer der invertierten Sequenzen der 2 μ m-DNA von S.cerevisiae die Replikation von chimären Plasmiden in S.pombe ermöglicht wurde (Gaillardin et al., 1983). Wenn das ganze 2 μ m-Plasmid in den chimären Plasmiden vorhanden war, erwies es sich als

instabil und wurde stark ungeordnet. Da in D.discoideum fast das gesamte genetische System auf von NC4 abstammenden Stämmen einschließlich HU32 basiert, könnte es vorteilhaft sein, das endogene Plasmid aus diesem genetischen Hintergrund, d.h. Ddp1 oder Ddp2 zu verwenden. Das 2.8kbp-EcoRI-Fragment aus Ddp1 könnte sich in der Konstruktion von Transformationsvektoren als wichtig erweisen.

Von biotechnologischer Seite besteht generell ein Bedarf für ein eukaryontisches Transformationssystem, das sich für die quantitative Produktion eukaryontischer Genprodukte eignet. Die bakteriellen Systeme haben mehrere Nachteile: Sie verfügen z.B. nicht über den Mechanismus des Speißens von RNA, sowie der Glykosylierung von Proteinen, welche eine besondere Bedeutung für die immunologische Reaktivität hat. Weiterhin sind die Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien für Eukaryonten toxisch. Für ein eukaryontisches System kommt z.B. S.cerevisiae unter Verwendung des autonom in hoher Kopienzahl replizierenden 2µm-Plasmids und des etablierten Transformationssystems in Betracht. Es bestehen jedoch Probleme mit der Glykosylierung und der Exkretion verschiedener Genprodukte (Valenzuela et al., 1982). Im allgemeinen denkt man bei D.discoideum nur an ein Modellsystem der Entwicklung. D.discoideum verfügt jedoch über Spleiß-Mechanismen (Firtel, pers. Mitt.) und Proteinglykosylierung (Ivatt et al., 1981), die den Mechanismen höherer Eukaryonten ähnlicher sind als diejenigen in Hefe. Durch die problemlose Anzucht der Standardstämme AX2 und AX3 in Fermentern könnte D.discoideum Vorteile für die angewand-

te Forschung haben. Sobald in D.discoideum ein Transformationssystem etabliert ist, stellt dieser Organismus eine Alternative dar.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien, Abkürzungen und Geräte

Chemikalien wurden - falls nicht anders angegeben - von Merck bezogen, wobei die höheren Reinheitsgrade verwendet wurden. Hier werden einige besondere Chemikalien und die im Text verwendeten Abkürzungen aufgeführt.

Ac	: Acetat
Amp	: Ampicillin (Sigma)
BSA	: Bovine serum albumine, Fraktion V, (Miles) Rinderserumalbumin
DEP	: Diethylpyrocarbonat (Fluka)
DMSO	: Dimethylsulphoxid (Sigma)
DTT	: Dithiothreitol
Ebr	: Ethidiumbromid; 2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridinium bromide (Sigma)
EDTA	: Titriplex III, Ethylendinitrilotetraessigsäure - Dinatriumsalz
Formaldehyd	: min 37%, stabilisiert mit 10% Methanol
HEPES	: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (Serva)
MOPS	: N-Morpholinopropansulfonsäure, analytical grade, (Serva)
NP40	: Nonidet NP40, Ethylphenylpolyethylenglykol, (Fluka)
NTG	: N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin (Sigma)
Sarcosyl	: N-Lauroyl-Sarcosine, Na-Salz, (Sigma)
SDS	: Dodecylsulfat-Na-Salz, reinst, (Serva)
Strep	: Dihydrostreptomycinsulphate, (Sigma)
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, reinst, (Serva)
Tet	: Tetracyclin (Sigma)
Tris	: Tris base, Tris (hydroxymethyl) aminomethan
DNase I	: Desoxyribonuklease I (Boehringer)
PEG	: Polyethylenglykol, verschiedene Molekulargewichte (Serva)
Pronase	: Proteinase unspezifisch, z.B. Type VI, Bacterial purified (Sigma)
RNase	: Ribonuklease unspezifisch, Ribonuclease A, von Rinderpankreas Typ II-A (Sigma)

Abkürzungen

A	: Adenosin
bp	: Basenpaare
C	: Cytosin
cc	: Plasmid in superhelikaler Form (covalently closed circles)
Ci	: Curie
DNA	: Desoxyribonukleinsäure

g	: Gramm
G	: Guanosin
h	: Stunde
k	: Kilo
min	: Minute
MG	: Molekulargewicht
mt	: mitochondriell
n	: nuklear
NT	: Nukleotid
oc	: Plasmid als offener Ring (open circle)
r	: ribosomal
RNA	: Ribonukleinsäure
RT	: Raumtemperatur
S	: Svedberg
sek	: Sekunde
T	: Thymin

Geräte

Schüttler

Lab shaker, 180rpm, Kühner
Clim-o-shake, IRC-1-U, 150rpm, Kühner

Zentrifugen

Centrifuge 5414, Eppendorf
Rotixa/KS, Hettich
Ultrazentrifuge TGA-65, Kontron
Rotoren: TI50, TI60, VTI50
Superspeed RC2-B, Sorvall
Universal Zentrifuge, Hettich

Weitere Geräte

Transilluminator, 302nm, Spectroline
Vortex-Genie, Bender & Hobein AG

6.2 Allgemeine Bemerkungen

Die Anzucht von D.discoideum und Bakterien auf Festmedium erfolgt in Petrischalen mit drei Entlüftungsnocken.

Alle Lösungen werden mit Wasser angesetzt, das durch eine Ionenaustauscheranlage (18,5 Megaohm-cm, Sybron, Barnstead) gefiltert wird, bzw. mit bidestilliertem Wasser.

Formamid und Formaldehyd werden deionisiert verwendet. Dazu werden ca. 100ml Flüssigkeit mit ca. 5g Ionenaustauscher (Kationen- und Anionenaustauscher; Mixed bed resin, AG 501-X8, 20-50 mesh, analytical grade, Bio-Rad) bei RT 30min schwach gerührt und anschließend der Ionenaustauscher abgefiltert (Maniatis et al., 1982).

Nukleinsäuren werden mit 2-3 Volumen absolutem Ethanol und 1/10 Volumen 3M NaAc pH 5.2 oder 10M LiCl bei -20°C über Nacht oder bei -70°C 1h gefällt. DNA-Präzipitate werden 20min bei 10000g abzentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem kleinen Volumen Puffer (z.B. TE, pH 7.5) aufgenommen (Maniatis et al., 1982).

Möglichst frisches, nicht oxidiertes Phenol wird im Vakuum bei 160°C destilliert, mit 0,1% 8-Hydroxyquinolin (Sigma) stabilisiert, mit Puffer (z.B. TE, pH 7.5) gesättigt und bei 4°C gelagert (Maniatis et al., 1982). (Falls das Phenol nicht mit 8-Hydroxyquinolin stabilisiert ist, wird es bei -20°C gelagert.)

RNase, DNase I, Pronase und BSA werden als Vorratslösungen (z.B. 10mg/ml in TE pH 7.5) angesetzt. RNase wird 15min bei 80°C zur Inaktivierung von DNasen inkubiert, Pronase 1h bei 37°C zur Beseitigung von DNasen selbstverdaut, und BSA zur Inaktivierung von DNasen 30min bei 65°C inkubiert. Aliquots werden bei -20°C gelagert (Maniatis et al., 1982).

Teilweise werden für das Arbeiten mit DNA und RNA silikonisierte Glas- und Plastikgeräte verwendet. Silikonisiert wird in einer 5%igen Dimethyldichlorsilanlösung in Tetrachlorkohlenstoff. Das Material wird 1h in der Flüssigkeit bzw. der Dampfphase inkubiert, anschließend gründlich mit Wasser gespült, getrocknet und sterilisiert (Maniatis et al., 1982).

Arbeiten zur Isolierung von und mit Nukleinsäuren werden - falls nicht anders angegeben - bei 4°C durchgeführt.

6.3 Liste der verwendeten Stämme

6.3.1 Bakterienstämme zur Anzucht von Dictyostelium discoideum

Klebsiella aerogenes: ein cobaltresistenter Stamm, wobei es sich um eine spontane Mutante von Stamm 1033 handelt, wird zur routinemäßigen Anzucht von D. discoideum verwendet (Ushiba & Magasanik, 1952; Williams, 1978).

Bacillus subtilis (B. subtilis) (Bs36.1): Strep^r ; ein Stamm der keine Sporen bildet, und niedriger Reversionsrate; er wird zur Bestimmung des B. subtilis-Sensibilitäts-Phänotyps (bsg) verwendet; bsg-Mutanten können B. subtilis nicht als Nahrungsquelle verwenden (Newell et al., 1977)

B. subtilis (BSU2): eine spontane cobaltresistente Mutante von Bs36.1, zur Selektion von Diploiden nach parasexuellen Kreuzungen unter Verwendung der bsg-Mutation und der dominanten Cobaltresistenz (Welker & Williams, eingereicht).

6.3.2 Bakterienstämme zur Transformation

Escherichia coli (E.coli)

HB101 : F⁻, hsdS20 (r⁻, m⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm^r), Byl-5, mtl-1, supE44, λ^{-} ;
 ein E.coli K-12 x E.coli B-Hybridstamm, der häufig als Rezipientenstamm in Transformationen verwendet wird, und eine gute Ausbeute an Plasmid-DNA ergibt (Maniatis et al., 1982);
 DH1 : F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44,
 (Maniatis et al., 1982; Hanahan, 1983);

6.3.3 Dictyostelium discoideum-Stämme (s. Appendix)

Die verwendeten Stämme, sowie die Genotypen und eine Liste der Loci, sind im Appendix aufgelistet.

6.4 Lösungen

a) Zum Ernten und Zellfraktionieren von D.discoideum

Lysepuffer zur Zellkernisolierung (Firtel & Lodish, 1973)

10mM MgAc
 10mM NaCl
 30mM HEPES
 10% Saccharose
 2% NP40
 pH 7.5 mit NH₄OH eingestellt

Lysepuffer für Zellkern- und Mitochondrienisolierung (Jacobson, 1976)

50mM HEPES pH 7.5
 5mM MgAc
 2% Cemusol NPT 12
 10% Saccharose

Phosphatgepufferte Saline (PBS). (Deering et al., 1970)

10mM KCl
 10mM NaCl
 16mM Na₂HPO₄
 32mM KH₂PO₄
 der pH der Lösung beträgt ~6,5

Saline (Bonner, 1947)

Ungepufferte Saline wird routinemäßig verwendet zum Verdünnen und Waschen von D.discoideum-Zellen.

10mM NaCl
 10mM KCl
 2.7mM CaCl₂

b) Zur Aufnahme von DNA

TE (Maniatis et al., 1982)

10mM Tris
 1mM EDTA
 pH 7.4, 7.5 oder 8 mit HCl eingestellt

c) Zur Plasmidisolierung

STET-Puffer (Holmes & Quigley, 1981)

8% Saccharose
5% Triton-X100
50mM EDTA
50mM Tris
pH 8

Alkalische SDS-Lösung (Birnboim & Doly, 1979)

0.2M NaOH
1% SDS
wird maximal eine Woche verwendet

Hochsalz-Neutralisierungslösung (Birnboim & Doly, 1979)

3M NaAc, pH 4.8 mit Eisessig eingestellt

*d) Zur Agarosegelelektrophorese*Loening-Puffer (Loening, 1969)

36mM Tris base
30mM NaH_2PO_4
1mM EDTA
pH 7.8 mit HCl einstellen
als 10x Vorratslösung ansetzen

Trisboratpuffer (TBE), (Maniatis et al., 1982)

89mM Tris
89mM Borsäure
0.5mM EDTA
der pH beträgt 8.3,
5x Vorratslösung ansetzen

Gelladepuffer (Maniatis et al., 1982)

50% Saccharose
1mM EDTA
2mg/ml Bromphenolblau
pH 7.5

oder

1x TBE
20% Ficoll 400 (Pharmacia)
0.01% Bromphenolblau
pH 8.3

*e) Zur Southern blot Analyse (Maniatis et al., 1982; Southern, 1975)*Denhardt's Reagenz

0.02% Ficoll 400, MG: 400 000 (Pharmacia)
0.02% Polyvinylpyrrolidone, MG: 40 000 (Sigma)
0.02% BSA
100x Vorratslösung ansetzen und bei
4°C lagern.

SSC

0.15M NaCl
 0.015M Tri-Natriumcitrat
 pH 7
 20x Vorratslösung ansetzen

Nick-Translationspuffer (NT-Puffer)

50mM Tris/HCl pH 7.5
 5mM MgCl₂
 4mM Dithiothreitol
 10x Vorratslösung, in Aliquots einfrieren

Vor- und Hybridisierungslösung (modifiziert nach

Mehdy et al., 1983)

50% Formamid
 2x SSC
 1% Sarcosyl
 4mM EDTA pH 7.2
 0.1% SDS
 4x Denhardt's Reagenz
 0.12M Phosphatpuffer pH 6.8 (s.u.)

Phosphatpuffer (Firtel & Bonner, 1972)

als 10x konz. Vorratslösung ansetzen aus 1.2M
 Na₂HPO₄ und 1.2M NaH₂PO₄, pH 6.8

Stopplösung für Nicktranslation

10mM Tris
 10mM EDTA
 pH 7.5

Equilibrieren von Sephadex G 50

15 g Sephadex G 50 (Pharmacia) werden mit ~200ml
 Stopplösung gemischt und 20 min autoklaviert.

*f) Für Formaldehydgele (Lehrach et al., 1977;
 Maniatis et al., 1982)*

Gelpuffer

20mM MOPS
 5mM NaAc
 1mM EDTA
 pH 8
 10x Vorratslösung angesetzt

Laufpuffer

wie Gelpuffer, jedoch pH 7

Polyacrylamidstopplösung

10% Acrylamid : Bisacrylamid, 59:1 (Serva)
 1x Gelpuffer
 0.25% (NH₄)₂S₂O₈
 0.025% TEMED

Probenpuffer

1x Gelpuffer
 50% Formamid deionisiert

6% Formaldehyd
als 5fach konzentrierte Vorratslösung ansetzen

Farbengemisch

25% Ficoll

0.3% Bromphenolblau

6.5 Kulturmedien

Ashax (Watts and Ashworth, 1970; Cocucci & Sussman, 1970)

Ashax wird zur bakterienfreien Anzucht von D.discoideum in Flüssigkultur verwendet; diese Kulturen werden auch als axenische Kulturen bezeichnet. Der Name des Mediums leitet sich von Ashworth und axenisch ab.

pro Liter:

Bacteriological peptone, Code L37 (Oxoid) 14.3 g

Yeast extract, Code L21 (Oxoid) 7.15 g

D-Glucose 15.4 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.28 g

KH_2PO_4 0.48 g

Dihydrostreptomycinsulfat (Sigma) 250 mg

pH 6.5

pH 7 einstellen, 20min autoklavieren; nach dem Abkühlen beträgt der pH 6.5.

Standard medium = SM (Sussman, 1966)

Das Standardmedium (SM) wird zur Anzucht von D.discoideum auf festem Nährboden in Verbindung mit Bakterien (K.aerogenes) verwendet.

pro Liter:

Bacteriological peptone, Code L37 (Oxoid) 10 g

Yeast extract, Code L21 (Oxoid) 1 g

D-Glucose 10 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g

KH_2PO_4 2.2 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.3 g

Bacto-Agar (Difco) 13 g

20 min autoklavieren und nach Abkühlen auf 60°C in Petrischalen abfüllen (ca 35 ml pro Petrischale).

Zusatz von Chemikalien zu SM oder Ashax

Cobaltchlorid $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Williams, 1978)

Cobaltchlorid wird dem Kulturmedium von einer sterilen Vorratslösung (100 mg/ml $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck) nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca 60°C zugegeben. Die entgeltliche Konzentration beträgt, falls nicht anders angegeben, 300 µg/ml (= 1.26mM) in SM und 150 µg/ml (0.63mM) in Ashax. Die im Text angegebene Konzentration in µg/ml bezieht sich immer auf das Molekulargewicht von $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ auch wenn nur CoCl_2 angegeben ist.

Für die anderen selektiven Medien sind die Konzentrationen der jeweiligen Chemikalien und Referenzen im Appendix angegeben.

LB (Luria-Bertani)-Medium (Maniatis et al., 1982)

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur oder (mit Agar) auf Festmedium

pro Liter:

Bacto tryptone (Difco)	10 g
Yeast extract, Code L21 (Oxoid)	5 g
NaCl	10 g
(Bacto-Agar (Difco)	15 g)

6.6 Kulturbedingungen von Dictyostelium discoideum

6.6.1 Lagerung (Welker & Williams, pers. Mitt.)

Ansetzen eines Silicagels (Reinhardt, 1966)

Sporen von ein bis drei mass plates (s. 6.6.2) werden in den Deckel einer Petrischale gesammelt, in ~0.3ml Pferdeserum (Oxoid) resuspendiert und auf ein bei -20°C vorgekühltes Silicagel gegeben (s.u.). Das Silicagel mit der Sporensuspension wird stark geschüttelt, um das Zusammenklumpen der Silicagelkristalle zu vermeiden und die Sporensuspension schnell eintrocknen zu lassen. Das Fläschchen wird zusätzlich mit Parafilm verschlossen und trocken bei +4°C gelagert. Die Sporen sind auf diese Weise 3-10 Jahre haltbar.

Die Silicagele werden folgendermaßen vorbereitet:

4ml Fläschchen (Wheaton) werden zu 2/3 mit Silicagel direkt aus der Flasche (Hopkin & Williams, Silica gel, purified, 6 to 22 mesh) gefüllt, 1 1/2 - 2 h bei 160°C trockensterilisiert, und anschließend trocken bei Raumtemperatur gelagert.

Einfrieren von Sporen

Sporen können wie oben beschrieben geerntet werden. Anschließend werden sie in Saline zu einer Konzentration von ~10⁶/ml resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Einfrieren von Amöben (Williams & Newell, 1976)

Amöben werden von einer Platte genommen und in einer Mischung von 45% Pferdeserum, 45% Saline und 10% DMSO aufgenommen, ~2h bei -20°C, für die gleiche Zeit bei -70°C gefroren und danach in flüssigen Stickstoff transferiert. Vor Verwendung müssen die Zellen schnell aufgetaut werden.

Lyophilisieren

Die Sporen werden in ~0.5ml Pferdeserum aufgenommen, 0.1ml

Aliquots in Ampullen lyophilisiert und im Vakuum verschlossen.

6.6.2 Anzucht auf festem Medium (SM. in Gegenwart von Bakterien)

Da die meisten in unserem Labor verwendeten Stämme temperatursensitiv sind, erfolgt die Anzucht von D.discoideum bei $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Der zur Anzucht von D.discoideum auf SM-Agar verwendete cobaltresistente K.aerogenes-Stamm (Williams und Newell, 1976) wird wöchentlich auf Cobalt-SM-Platten ausgestrichen, und von einer einzelnen Kolonie ausgehend mehrere SM-Platten ausplattiert. Nach zweitägiger Bebrütung bei 21°C werden die mit einem dichtem Bakterienrasen bewachsenen Platten bei 4°C gelagert.

B.subtilis wird entsprechend angezogen.

Ansetzen und Überimpfen von Vorratsplatten, klonalen Platten "clearing plates", "massplates"

Ständig verwendete Stämme werden auf klonalen Platten kultiviert. Dazu wird eine SM-Platte zunächst mit 0.1ml einer K.aerogenes-Suspension (10^8 - 10^9 Bakterien/ml Saline) ausgespatelt, und man läßt die Platten in einer sterilen Arbeitsbank antrocknen. In Saline resuspendierte Sporen (aus Silicagel oder von klonalen Platten) bzw. Amöben (von klonalen Platten) werden auf den so vorbereiteten SM-Platten ausgestrichen (Verdünnungsstrich, 10-20 Zellen/Platte). Wenn Sporen aus Silicagel verwendet werden, werden zusätzlich noch einige Kristalle auf die Platte gebracht.

Die Platten werden mit dem Deckel nach unten bei 21°C inkubiert. Nach einer Woche sind einzelne D.discoideum-Kolonien auf dem Bakterienrasen gewachsen; im Zentrum der Klone sind Fruchtkörper ausgebildet, den Rand bildet die amöboidale Wachstumszone. Die klonalen Platten werden wöchentlich überimpft und werden zum Ansetzen von "mass plates" und axenischen Kulturen verwendet. Für mass plates werden 10^4 - 10^5 Sporen oder Amöben mit Bakterien auf SM-Platten ausgespatelt. Nach 48h sieht man klare Stellen in dem Bakterienrasen, d.h. daß sich an diesen Stellen D.discoideum durch die Bakterien durchgefressen hat. Diese Platten werden als "clearing plates" bezeichnet und sie enthalten $\sim 3 \times 10^8$ Zellen/Platte. Später bilden sich Zellaggregat, und nach ungefähr vier Tagen ist die Platte mit Fruchtkörpern bedeckt.

6.6.3 Axenische Kulturen (bakterienfreie Flüssigkultur). (Watts & Ashworth, 1970)

Ausgehend von einer Vorratsplatte werden Amöben oder Sporen in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25ml axenischem Medium (Ashax) inoculiert und bei 21°C und 150 bzw. 180rpm geschüttelt. (Es gibt jedoch einige Stämme, wie z.B. NP73 und NP84, bei denen die Sporen in axenischem Medium nicht

keimen.) Die Zell- bzw. Sporenkonzentration soll nicht unter 10^4 /ml liegen. Da der zur Anzucht auf SM verwendete K.aerogenes-Stamm im Gegensatz zu D.discoideum, Strep^s ist, ist das Animpfen der Kulturen in Gegenwart von K.aerogenes möglich.

Axenische Kulturen werden zweimal wöchentlich in frisches Medium (Ashax) überimpft, und zwar von einer Dichte von $\sim 2\text{-}5 \times 10^6$ Zellen auf $\sim 2 \times 10^4$ Zellen/ml Ashax. Bei langsam wachsenden Stämmen (z.B. HU1231) erfolgt das Verdünnen auf eine Dichte von $\sim 10^5$ Zellen/ml Ashax.

6.6.4 Methoden der parasexuellen Genetik (Welker & Williams, 1982a)

Kreuzungen

Für eine parasexuelle Kreuzung werden je $\sim 5 \times 10^5$ der beiden Elternstämme, die den gleichen Paarungstyp haben, vom Rand eines Klons genommen, in 0.5ml 20mM CaCl₂ resuspendiert und bei 150-200rpm über Nacht geschüttelt. Die Koaggregate werden mechanisch mit einer Pipette disaggregiert und auf den für die Diploidenselektion erforderlichen selektiven Platten ausplattiert (0.5ml Zellsuspension auf ~ 3 Platten). Falls die Selektion über sich komplementierende ts-Mutationen erfolgt, werden die Platten bei 27°C inkubiert. Falls eine bsg-Mutation an der Selektion beteiligt ist, werden die Zellen auf B.subtilis (Strep^r) in Gegenwart von $\sim 30\mu\text{g/ml}$ Strep (zur Beseitigung von K.aerogenes, Strep^s) ausplattiert. Wenn die instabile Cobaltresistenz verwendet wird, erfolgt die Selektion der Diploiden auf Cobalt-SM und den Bedingungen der zusätzlich erforderlichen, rezessiven, conditional letalen Mutation, z.B. 27°C bei einer ts-Mutation. Nach 3-10 Tagen sind einzelne Kolonien sichtbar. Sie werden unter nicht-selektiven Bedingungen kloniert, die Ploidität (Sporengröße) geprüft, und Silicagele angesetzt.

Haploidisierung und Charakterisierung der Segreganten

Zur Haploidisierung werden die Diploiden auf Thiabendazol-SM ($2\mu\text{g/ml}$) oder Benlate-SM (20, 35 oder $50\mu\text{g/ml}$) ausplattiert ($\sim 50\text{-}200$ Zellen/Platte) und bei 21°C inkubiert; anschließend werden einzelne Klone auf SM und die für die Bestimmung des Genotypes erforderlichen selektiven Platten und Bedingungen zur Charakterisierung gebracht (6-10 Segreganten / Platte; s. Appendix), wobei phänotypisch möglichst verschiedene Klone (z.B. Größe und Morphologie) ausgewählt werden. Beim Überprüfen der Cobaltresistenz werden die Segreganten kreisförmig auf der Petrischale angeordnet, da die Toxizität in Abhängigkeit von der Entfernung zum Rand unterschiedlich ist.

An auf SM gewachsenen Klonen wird die Ploidität, Sporenform und Farbe der Fruchtkörper überprüft.

Um Probleme durch gemischte Kolonien zu vermeiden, empfiehlt es sich, die Segreganten vor der Charakterisierung auf SM zu klonieren.

6.6.5 Überprüfen der instabilen dominanten Cobaltresistenz (cob-354)

Von einer Kolonie werden Amöben bzw. Sporen genommen, und davon ausgehend eine klonale SM-Platte (~ 25 Zellen), eine klonale Cob-SM-Platte (~ 100) Zellen und jeweils eine SM- und Cobalt-SM-massplate ($\sim 10^5$ Zellen) angesetzt.

Nach 4 Tagen Bebrütung wird die Plattierungseffizienz auf SM, und nach 7-10 Tagen auf Cobalt-SM. Von der klonalen SM Platte werden Amöben eines Klonen mit einem Durchmesser von ~ 1 cm genommen (1 cm Koloniedurchmesser entspricht ~ 25 Generationen). Amöben vom Rand einer auf SM angezogenen Kolonie werden erneut, wie oben beschrieben, ausplattiert.

Mit Zellen aus Flüssigkultur wird das Überprüfen analog durchgeführt. Axenisch gewachsene Zellen werden in der erforderlichen Verdünnung mit Bakterien ausplattiert. Das in Ashax enthaltene Streptomycin wird dabei genügend verdünnt, daß Wachstum von K.aerogenes möglich ist.

6.6.6 Ernten

Die Zellen werden in einem Ausschwingrotor bei 4°C geerntet. Bei auf festem Medium in Verbindung mit K.aerogenes gewachsenen Zellen entspricht 1 ml Zellsniederschlag $\sim 10^9$ Zellen. In axenischer Kultur sind die Zellen teilweise multinuklear, und haben ein entsprechend größeres Volumen; d.h. weniger als 10^9 gezählte Zellen ergeben 1 ml Zellsniederschlag; man geht davon aus, daß 1 ml auch $\sim 10^9$ haploiden mononuklearen Zelläquivalenten entspricht (s. auch 3; Zada-Hames & Ashworth, 1977; Williams, 1980).

Axenische Kulturen werden in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von $\sim 2-5 \times 10^6$ Zellen/ml geerntet. Die Zellsuspension wird 3 min bei 300g abzentrifugiert, der Zellsniederschlag in Saline resuspendiert, erneut 2 min bei 300g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschvorgang wird zweimal wiederholt, und die Zellen werden anschließend in Puffer (z.B. TE, pH 7.5) aufgenommen.

Zellen von Platten ("clearing plates) können folgendermaßen geerntet werden:

- (f) Das Zellen-Bakteriengemisch wird direkt mit Saline geerntet und 3 min bei 300g zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Der Waschvorgang wird solange wiederholt (mind. 3x) bis der Zellsniederschlag "bakterienfrei" ($\sim 10^5$ Bakterien/ml Zellen) ist. Die Kontamination an Bakterien kann auch durch extensivem Waschen nur geringfügig reduziert werden; es sind auch noch die Bakterien, die gerade erst vor dem Ernten von der Zelle phagozytiert wurden, zu berücksichtigen. Nach dem Waschen werden die Zellen in Puffer aufgenommen.

- (g) Die Platten werden mit PBS (Deering et al., 1970) geerntet (10 Platten in 300ml PBS) und die Zellen-Bakterien-Suspension wird über Nacht geschüttelt und anschließend, wie oben für axenische Zellen beschrieben, geerntet. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Reduktion der Bakterienzahl und einer höheren Zellausbeute, wobei die Zellen in die Entwicklungsphase übergehen. Weiterhin ist - verglichen mit der Anzucht auf Platten - ein größerer Grad von Synchronisation möglich; dies ist für Entwicklungsstudien wichtig.

6.6.7 Zellfraktionierung

6.6.7.1 Isolierung von Zellkernen (Firtel & Lodish, 1973)

Die hier beschriebene Methode resultiert in einer rohen Kernpräparation, die als Ausgangsmaterial für DNA-Präparationen verwendet wird. Die Kernpräparationen, die zur Lokalisierung des Plasmids Ddp1 in der Zelle verwendet wurden, sind durch Zentrifugation extensiver gereinigt worden (s.u.).

Prinzipiell erfolgt das Ernten wie für ganze Zellen beschrieben, jedoch wird nicht mit Saline, sondern mit eiskaltem Wasser geerntet bzw. gewaschen (Charlesworth & Parish, 1975). Durch den osmotischen Schock werden die Zellen etwas fragiler und die Lyse der Zellmembran erleichtert. Der letzte Zellschlag wird in Lysepuffer (Firtel & Lodish, 1973) aufgenommen und geschüttelt (~5-10ml eiskalter Lysepuffer pro 1ml Zellschlag); die Lyse wird im Mikroskop überprüft. Wenn >95% der Zellen lysiert sind, werden die Kerne 10min bei 9000g zentrifugiert und der cytoplasmatische Überstand verworfen (bei dieser Geschwindigkeit werden auch die Mitochondrien abzentrifugiert; die Präparationen sind jedoch weitgehend frei von mitochondrieller DNA). Die Kerne können z.B. in einem kleinen Volumen Lysepuffer aufgenommen und für Plasmid-DNA-Präparationen verwendet werden (s. 6.8).

6.6.7.2 Zellfraktionierung durch sequentielle Zentrifugation (modifiziert nach Jacobson, 1976)

Die Trennung der Zellfraktionen (Zellkerne und Mitochondrien) erfolgt hier sorgfältiger als in 6.6.7.1 beschrieben.

Zellen werden nach Waschen mit Saline in Lysepuffer (Jacobson, 1976) aufgenommen und gemischt, bis eine Zellyse von mindestens 95% erreicht ist. Die restlichen ganzen Zellen werden durch eine leichte Zentrifugation abgetrennt (2min, 200g) und verworfen. Der Überstand wird 5min bei 3500g zentrifugiert, wodurch die meisten Kerne abgetrennt werden; der cytoplasmatische Überstand enthält die Mitochondrien. Die Zellkerne können nach dreimaligen Waschen mit Lysepuffer z.B. für eine Plasmidpräparation verwendet werden.

Die Qualität des ersten cytoplasmatischen Überstandes, der die Mitochondrien enthält, wird im Mikroskop überprüft und der 3500g-Zentrifugationsschritt, zur Abtrennung restlicher

Zellkerne, wiederholt. Der daraus resultierende Überstand mit den Mitochondrien wird 10min bei 15000g abzentrifugiert. Unter dem Mitochondrienniederschlag ist ein sehr kleines, festes Kernpräzipitat. Nur die Mitochondrien werden vorsichtig in einem kleinen Volumen TE resuspendiert und erneut 5min bei 3500g zentrifugiert und der winzige Kernniederschlag wird verworfen. Der Überstand wird im Mikroskop geprüft, eventuell nochmals mit TE gewaschen und anschließend eine Plasmidpräparation durchgeführt (s. 6.7).

6.7 DNA-Isolierung aus Dictyostelium discoideum

6.7.1 Plasmidpräparation (Birnboim & Doly, 1979)

Die D. discoideum-Zellen werden, wie in 6.6.6 oder 6.6.7 beschrieben, geerntet. Die Zellen oder Kerne werden in einem geeigneten Volumen TE pH 7.5 /50mM Glucose gesättigt mit ~1% v/v DEP (J. Williams, pers. Mitt.) aufgenommen (z.b. 1 ml Zellniederschlag mit 5 ml Lösung; man erhält somit ~6ml Zellsuspension). Es wird ein gleiches Volumen alkalischer SDS-Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Suspension wird schnell klar und viskos. Das Lysat wird 10 min auf Eis inkubiert. Man berechnet 3/4 des Volumens, das an alkalischer SDS-Lösung zugegeben wurde; diese Menge wird nun an Hochsalzneutralisierungslösung zugegeben. Die hohe Salzkonzentration bewirkt die Fällung denaturierter hochmolekularer DNA, RNA und Proteine, wogegen die Plasmid-DNA bei neutralem pH spontan renaturiert. Um eine möglichst effiziente Fällung der hochmolekularen Bestandteile zu erreichen, wird das Gemisch eine Stunde auf Eis inkubiert, und anschließend 30min bei 12000g abzentrifugiert. Der Überstand enthält die nicht gefällte Plasmid-DNA, die mit 2 Volumenanteilen Ethanol gefällt wird. Die Plasmid-DNA wird 20min bei 12000g abzentrifugiert, der Niederschlag luftgetrocknet, in einem kleinen Volumen TE, pH 7.5 aufgenommen und auf einem Agarosegel auf Plasmid-DNA geprüft, wobei durchschnittlich $\sim 5 \times 10^7$ Zelläquivalente aufgetragen werden.

6.7.2 Reinigung von Plasmid-DNA

Die kontaminierende RNA in der Plasmid-DNA-Lösung aus 6.7.1 wird mit RNase (Endkonzentration $\sim 100 \mu\text{g/ml}$) 30min bei 37°C verdaut. Es schließt sich eine Ethanol-fällung an (Maniatis et al., 1982).

Zur Reduktion des Kohlenhydratgehaltes in der Plasmid-DNA-Lösung (insbesondere bei Präparationen aus ganzen Zellen) wird das Glykogen bei 4°C und 15000g zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Durch Phenolextraktion werden die restlichen Proteine entfernt (Maniatis et al., 1982).

Zu der DNA-Lösung wird ein gleiches Volumen Phenol (gesättigt mit TE, pH 7.5): Chloroform (1:1) zugegeben und gemischt. Bei chromosomaler DNA wird sehr vorsichtig, bei Plasmid-DNA etwas kräftiger gemischt; anschließend werden

die Phasen durch Zentrifugation getrennt (5min, 6000g). Die Phenolextraktion wird 2-3mal wiederholt (bis keine Interphase mehr sichtbar ist). Für die zweite Phenolextraktion empfiehlt es sich, die Interphase nochmals zu extrahieren, um größere und selektive DNA-Verluste zu vermeiden. Zur Beseitigung des restlichen Phenols wird danach mit Chloroform extrahiert, und die DNA schließlich mit Ethanol gefällt.

Die Plasmid-DNA kann durch eine selektive Fällung von DNA mittels Spermin (Spermin-tetra-hydrochlorid, Serva, reinst) weiter gereinigt werden (Hoopes & McClure, 1981). Zu der DNA in TE werden KCl und Spermin (100mM bzw 3mM Endkonzentration) zugegeben, gemischt und 20min bei 4°C inkubiert; das Präzipitat wird anschließend abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wird mit 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und in TE aufgenommen. Der Spermin-DNA-Komplex löst sich nicht immer. Das Spermin kann durch Dialysieren des Niederschlages entfernt werden. Dazu wird das Präzipitat in Hochsalzpuffer (0,5 M NaCl, 50mM Tris pH 8, 10mM EDTA) gelöst und 24h gegen diesen Puffer und anschließend TE dialysiert.

Eine weitere Möglichkeit, das Spermin zu entfernen, besteht im Waschen des Spermin-DNA-Präzipitats mit Extraktionspuffer (75% Ethanol, 0,3M NaAc, 10mM MgAc). Der DNA-Spermin-Niederschlag wird in Extraktionspuffer resuspendiert, 1h bei 4°C inkubiert und dieses mehrmals gemischt; anschließend wird der DNA-Niederschlag wieder abzentrifugiert in TE aufgenommen.

Eine Möglichkeit zur Reinigung und Anreicherung von cccDNA bietet die saure Phenolextraktion (Zasloff et al., 1978). Die Plasmid-DNA wird nach RNase-Verdau und Phenolextraktion in 1mM Tris/1mM EDTA, pH 8 gelöst. Es werden 1/20 Volumen 1M NaAc pH 4, 1/20 Volumen 1,5 M NaCl und 1 Volumen Phenol (gesättigt mit 50mM NaAc, pH 4) zugegeben, 2min kräftig gemischt und die Phasen durch Zentrifugation (5min, 6000g) getrennt. Je nach Ausgangsmaterial sind 1-4 saure Phenolextraktionen nötig, um eine Anreicherung auf >95% ccc Plasmid-DNA zu erhalten. Anschließend wird die Plasmid-DNA-Lösung mit 1/20 Volumen 1M Tris/HCl pH 8,6 neutralisiert, mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

Weiterhin kann eine Trennung bestimmter DNA-Species über ein präparatives Gel erfolgen (Maniatis et al., 1982). Die DNA wird auf ein 0,5% Agarosegel in TBE mit 10µg/ml Ebr in einen relativ großen (ca. 20x3mm) Probenauftragsschacht gebracht und solange elektrophoretisiert, bis eine gute Separation der Banden erfolgt ist. Die gewünschten Banden werden im UV-Licht aus dem Gel geschnitten und in ein neues Gel (0,5% Agarose, 10µg/ml Ebr) direkt am Probenschachtformer eingebettet. Nach dem Abkühlen der Agarose wird der Former entfernt und der entstandene Trog mit TBE gefüllt und die DNA in den Trog elektroeluiert (30sek, ca 400V), der Puffer, der die eluierte DNA enthält, aus den Trog genommen und ersetzt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis

keine DNA mehr im UV-Licht sichtbar ist. Die DNA kann entweder durch Ethanol-fällung mit LiCl oder mit Elutip (s. unten) konzentriert und von störenden Stoffen gereinigt werden.

Bei "Elutip" handelt es sich um eine von Schleicher & Schüll bezogene Minisäule in einer Pipettenspitze zum Konzentrieren und Reinigen von DNA. Elutip wird nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

(Niedrigsalzpuffer: 0.2M NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA)

(Hochsalzpuffer : 1M NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA)

Mit Hochsalzlösung wird die Matrix des "Elutip" vorgewaschen und anschließend mit Niedrigsalzlösung vorbereitet. Die DNA wird zunächst über einen vorgeschalteten 0.45µm Nitroacetat-filter von größeren Partikeln gereinigt und anschließend langsam über die Säule gefiltert; mit Niedrigsalzpuffer wird gründlich nachgewaschen und die DNA mit einem kleinen Volumen Hochsalzlösung langsam eluiert. Die DNA kann durch Ethanol-fällung weiter konzentriert, bzw. in einem Puffer mit geringerer Salzkonzentration aufgenommen werden.

CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation ist jedoch für eine Reinigung größerer Mengen die beste Reinigungsmethode.

Plasmid DNA wird in TE aufgenommen. Es werden 0.92g CsCl/ml und 400µg/ml Ebr zugegeben. Die Mischung wird in Polyallomerzentrifugenröhrchen gefüllt, mit Paraffin (dünnflüssig) überschichtet, mit Aluminiumdeckeln luftfrei verschlossen und mindestens 24h bei 15°C und 80000g zentrifugiert.

Im UV-Licht wird durch Seitenpunktur zuerst die restliche chromosomale DNA abgezogen, anschließend der Bereich des Gradienten mit der Plasmid-DNA. Zur weiteren Reinigung kann die Zentrifugation wiederholt werden. Das Ebr wird durch mehrmalige Extraktion mit Isopropanol (gesättigt mit TE und >3M NaCl) entfernt. Die DNA-CsCl-Lösung wird anschließend mit 2 Teilen Wasser verdünnt und die DNA mit 6 Teilen Ethanol gefällt (1h, -20°C).

6.7.3 Isolierung genomischer DNA

Zellen werden, wie in 6.6.6 und 6.6.7 beschrieben, geerntet. Es können ganze Zellen oder Zellkerne verwendet werden. Der Niederschlag wird in einem kleinen Volumen TE (bei ganzen Zellen) oder Lysepuffer (bei Kernen) resuspendiert, mit 0.2M EDTA pH 8.4 / 2% Sarcosyl (auf 65°C vorgewärmt) wird auf 25ml aufgefüllt, vorsichtig gemischt und das Lysat 30min bei 65°C inkubiert (Pirtel & Bonner, 1972).

Pro 1ml Lösung werden 0.92g CsCl und Ebr zu einer Endkonzentration von 400µg/ml zugegeben und in Polyallomerzentrifugenröhrchen zentrifugiert (Einzelheiten s. oben). Die chromosomale DNA-Bande wird mit einer Pipette mit einer möglichst weiten Öffnung von oben abgezogen, mit dem gleichen Volumen absolutem Ethanol (RT) überschichtet. Die beiden Phasen werden durch leichtes Drehen des Röhrchens gemischt. Die DNA beginnt an der Grenzfläche der beiden Phasen auszufallen; nachdem sich die beiden Phasen völlig vermischt haben, wird

die DNA mit Hilfe einer ausgezogenen und hckchenfrmig umgebogenen Pasteurpipette herausgenommen, zweimal in Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in TE aufgenommen. Es schließt sich eine Phenolextraktion an. Die Menge und Qualität der DNA wird auf einem Agarosegel bzw. OD-Messungen (260 und 280nm) bestimmt; eine OD₂₆₀-Einheit entspricht 50µg DNA (Maniatis et al., 1982).

6.8 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme wurden von Boehringer, BRL oder Biolabs bezogen. Der DNA-Verdau wird in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Prinzipiell lassen sich - abhängig von der Salzkonzentration - drei Kategorien von Restriktionsenzympuffern unterscheiden (Maniatis et al., 1982) :

- a) niedrige Salzkonzentration
(ClaI, Sau96I, XmaIII)
kein NaCl
10mM Tris/HCl pH 7.5
10mM MgCl₂
1mM DTT
- b) mittlere Salzkonzentration
(BamHI, BclI, BglI, BglII, EcoRI, HincII = HindII,
HindIII, PstI, PvuII, Sau3A, SphI)
50mM NaCl
die weiteren Komponenten wie in a)
- c) hohe Salzkonzentration
(EcoRV, HinfI, SalI, TaqI, XhoI)
100mM NaCl - 150mM NaCl
die weiteren Komponenten wie in a)

In den Empfehlungen des Herstellers variieren z.B. die Salzkonzentrationen, β-Mercaptoethanol (~6mM) wird anstelle von DTT zugegeben, der pH liegt im Bereich zwischen 7 und 8. Bei vielen Enzymen wird zur Stabilisierung 100µg/ml BSA zugegeben.

Für die Restriktionsenzyme HpaI und SmaI wird folgender Puffer verwendet: 20mM KCl, 10mM Tris/HCl (pH 7.4 für HpaI; pH 8 für SmaI), 10mM MgCl₂, 1mM DTT.

Die Restriktionsenzymspaltung wird in einem Volumen von 50µl durchgeführt. Im allgemeinen wird ein Überschuß an Restriktionsenzym eingesetzt, Plasmid-DNA wird im allgemeinen 1-2h, chromosomale DNA mehrere Stunden bzw. ber Nacht verdaut. Die Standardtemperatur ist 37°C. Ausnahmen sind folgende Enzyme: BclI (50°C), SmaI und XmaIII (25°C) und TaqI (65°C).

6.9 Agarosegelelektrophorese (Maniatis et al., 1982)

Die Elektrophorese wird in horizontalen Gelkammern durchgeführt. Als Puffersysteme werden Loening-Puffer bzw.

Trisboratpuffer verwendet. Die Standardagarosekonzentration liegt zwischen 0.5 und 0.8% (Seakem ME Agarose, FMC Corporation Marine Colloids Div., Rockland, ME 04841, USA). Bei präparativen Gelen wird teilweise Agarose mit einem niedrigeren Schmelzpunkt verwendet (Sea Plaque Agarose, FMC Corp.).

Die Agarose wird in Gelpuffer gelöst, auf $\sim 60^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und in die Gelkammern mit dem Auftrageschachtformer gegossen. Nach 30min kann der Auftrageschachtformer herausgezogen und die Gelkammer mit dem entsprechenden Puffer aufgefüllt werden.

Zur Orientierung auf dem Gelen wird HindIII verdaute λ -Phagen-DNA (Boehringer) verwendet, wobei die DNA-Fragmente folgender Größe entstehen:
23.61, 9.64, 6.64, 4.34, 2.26, 1.98, 0.56, 0.14 kb.

Ein weiterer Marker ist EcoRI verdaute Gesamt-DNA von D. discoideum-Stamm AX3. Die Fragmente der mitochondriellen (mt) und ribosomalen (r) DNA haben folgende Größe (Cockburn et al., 1978; Fukuhara, 1982):
30 (mt), 19 (mt), 15 (r), 10 (r), 7.2 (r), 5.7 (r), 5.1 (r), 3.4 (mt), 2.8 (r), 1.45 (r), 1.3 (mt) kb.

Die Proben in einem kleinen Volumen werden mit wenigen μl Farbenmix gemischt, und in die Auftrageschächte gebracht und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wird beendet, wenn das Bromphenolblau 1-2cm vom Ende des Gels entfernt ist.

Das Gel wird mit $10\mu\text{g/ml}$ Ebr angefärbt, und zur Reduktion des Hintergrundes kurz in Wasser entfärbt; fotografiert wird im UV-Licht mit einem Rotfilter. Als Filme werden Polaroid Positiv - (Nr 667) bzw. Positiv/Negativ - Filme (Nr 665) verwendet. Zur besseren Orientierung kann ein Lineal mitphotografiert werden.

6.10 Southern blot-Analyse (Southern, 1975; Maniatis et al., 1982)

6.10.1 Denaturierung von Agarosegelen

Auf einem Agarosegel aufgetrennte DNA wird $2 \times 15\text{min}$ in je 250ml $0.5\text{N NaOH}/1\text{M NaCl}$ denaturiert, danach $2 \times 30\text{min}$ in je 250ml $3\text{M NaCl}/0.5\text{M Tris/HCl}$, pH 7.5 neutralisiert (mit pH-Papier überprüfen), und 20min in $20 \times \text{SSC}$ gewaschen. In den Fällen, in denen ungeschnittene DNA verwendet wird, ist teilweise eine saure Depurinierung der DNA vorgeschaltet ($2 \times 15\text{min}$ in je 250ml 0.25N HCl). Im allgemeinen ist dies jedoch nicht nötig, da durch das Photographieren des Gels im UV-Licht genügend Strangbrüche in die DNA eingeführt werden.

6.10.2 Southern Transfer

Der Transfer der DNA aus dem Gel auf Nitrozellulose wird

nach Southern (1975) durchgeführt. In einem Behälter, der 7cm hoch mit 20xSSC gefüllt wird, befindet sich ein Ständer mit Glasplatte, darauf ein saugfähiges Filterpapier oder Tuch, das mit 20xSSC getränkt ist und auf zwei Seiten in die Flüssigkeit eintaucht. Darauf werden zwei mit 20xSSC getränkte Filterpapiere (Whatman 3mm) gelegt, anschließend das vorbereitete Agarosegel. Das Agarosegel ist etwas kleiner als die Glasplatte. Diese freien Stellen werden mit Parafilm abgedeckt.

Die Nitrozellulose (BA85, Schleicher & Schüll) - in Gelgröße zugeschnitten - wird zuerst in Wasser angefeuchtet, anschließend mindestens 10min in 20xSSC eingeweicht und anschließend luftblasenfrei auf das Agarosegel aufgebracht und zwei weitere in 20xSSC eingeweichte und dann zwei trockene Filterpapiere (Whatman, 3mm) in Gelgröße aufgelegt. Um eine hohe Saugkapazität zu erreichen, werden 5cm Saugpapier (Apura Einmalhandtücher) in entsprechender Größe darübergeschichtet, der Stapel beschwert, mit Frischhaltefolie abgedeckt; die DNA wird über Nacht auf die Nitrozellulose übertragen.

Nach dem Transfer werden auf der Nitrozellulose die Auftrageschächte markiert und anschließend das Gel entfernt. Im UV-Licht wird die Vollständigkeit des Transfers überprüft. Der Filter wird kurz in 4xSSC gewaschen, um evtl. noch daranhängende kleine Gelstücke u.ä. zu entfernen, luftgetrocknet und 2-4 h bei 60-80°C im Vakuum zur Fixierung der DNA gebacken. Anschließend kann der Filter trocken und kühl gelagert, bzw. gleich vorhybridisiert werden.

6.10.3 Nick-Translation der Probe (Rigby et al., 1977)

Die Nick-translation wird modifiziert nach Rigby et al., 1977, durchgeführt. Die Reaktion findet in einem 20µl Reaktionsgemisch statt:

2µl 10xNT-Puffer
2µl dCTP/TTP/GTP-Gemisch je 660µM
5µl α P³² dATP (50µCi) *
1µl DNA (Probe) = 0.5µg DNA
4µl DNase I (0.1µg/ml)
1µl DNA Polymerase I (1-2 Einheiten, DNase-frei; Boehringer)
5µl Wasser

Das Gemisch wird 1h bei 15°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100µl Stopplösung beendet.

* Deoxyadenosin 5' - [α ³²P] Triphosphat, Triethylammonium-Salz in stabilisierter wäßriger Lösung (NEN oder Amersham):

Spezifische Aktivität	800-3200Ci/mmol
Radioaktive Konzentration	10mCi/ml
Konzentration	0.0031µmol/ml

6.10.4 Reinigung und Denaturierung der Probe

Eine 1ml-Spritze wird mit äquilibriumiertem Sephadex G50 gefüllt und in ein 15ml Corex zentrifugenröhrchen gesetzt, die überschüssige Flüssigkeit durch Zentrifugation entfernt und verworfen; anschließend wird ein Eppendorfhütchen ohne Deckel in das Corex zentrifugenröhrchen gegeben, die Säule erneut aufgesetzt, das gestoppte Nicktranslationsgemisch aufgetragen, und die Säule mit Parafilm verschlossen und 5min bei 2000g abzentrifugiert. Die freien Nukleotide bleiben in der Säule hängen; im Ausschlußvolumen, das sich im Eppendorfröhrchen sammelt, befindet sich die ^{32}P markierte DNA. Die nick-translatierte DNA wird 5min bei 100°C denaturiert, in Eiswasser schnell abgekühlt und dem Hybridisierungspuffer zugegeben. Die spezifische Aktivität der Probe beträgt $>5 \times 10^7$ cpm (Cerenkov)/ μg DNA.

Zum Absättigen unerwünschter Sequenzen kann die radioaktive Probe vorhybridisiert werden (A. Noegel, pers. Mitt.). Dies ist z.B. bei Hybrid-DNA zur Absättigung der Vektorsequenzen erforderlich. Man gibt der radioaktiven Probe vor dem Denaturieren einen >20 -fachen Überschuß an DNA (z.B. Vektor) zu; das DNA-Gemisch wird wie oben beschrieben denaturiert, dem Hybridisierungspuffer zugegeben und man läßt die Probe $>2\text{h}$ vor der Zugabe zu dem Nitrozellulosefilter (s.u.) bei 37°C vorhybridisieren.

6.10.5 Vorhybridisierung und Hybridisierung des Southern blots (modifiziert nach Mehdy et al., 1983)

Der vakuumgebackene Nitrozellulosefilter wird mit 50-100ml Vorhybridisierungslösung mindestens 4 Stunden bei 37°C vorhybridisiert, Anschließend wird der Filter in einen Plastikbeutel gepackt. 5ml Hybridisierungslösung mit der denaturierten nick-translatierten Probe werden zugegeben, der Beutel wird möglichst luftblasenfrei zugeschweißt, und der Filter über Nacht bei 37°C hybridisieren lassen. Bei genomischen Southern blots wird eine ganze Nick-Translation zugegeben, bei Plasmid-blots etwa 1/10 einer Reaktion.

6.10.6 Waschen des Nitrozellulosefilters (Mehdy & Firtel, 1983)

Die Hybridisierungslösung wird entfernt, der Filter mehrmals mit $0,3 \times \text{SSC}$ im Plastikbeutel gewaschen, aus dem Beutel genommen, $3 \times 30\text{min}$ mit $\sim 100\text{ml}$ $0,3 \times \text{SSC}$ bei RT, anschließend 2h bei 37°C in Formamidwaschpuffer (Hybridisierungslösung ohne Denhardt's Reagenz), und $3 \times 30\text{min}$ in $0,3 \times \text{SSC}$, gewaschen. Der Filter wird luftgetrocknet und in Frischhaltefolie verpackt. Falls stringenter Waschbedingungen zur Reduzierung von Hintergrundhybridisierung erforderlich sind, kann sowohl bei der Hybridisieren als auch beim Waschen des Filters der Formamidgehalt erhöht und/oder SSC-Gehalt erniedrigt werden.

Die Hybridisierungslösung mit Probe kann mehrmals (maximal 4x) verwendet werden. Sie wird bei -20°C gelagert und vor Gebrauch auf 37°C erwärmt (A. Noegel, pers. Mitt.).

6.10.7 Röntgenfilmanalyse (Maniatis et al., 1982)

Der Nitrozellulosefilter wird in einen Röntgenfilmhalter (X-Ray Exposure holder, Kodak) gelegt, und bei Raumtemperatur oder -70°C mit Verstärkerfolie (Quanta III, intensifying screen, DuPont) ein Röntgenfilm exponiert. Der Röntgenfilm wird mit Röntgenfilmentwickler (G150, Agfa Gevaert), einer 1.5% Essigsäurestopplösung entwickelt und mit Röntgenschnellfixierbad (G334, Agfa Gevaert) fixiert.

Nach der Röntgenfilmanalyse kann der Nitrozellulosefilter nach Abschmelzen der Probe wiederverwendet werden. Dazu wird er in $0.3 \times \text{SSC}/10\text{mM EDTA pH } 8.0/0.1\% \text{ SDS}$ auf 100°C erhitzt und eine Minute inkubiert. Nach kurzem Spülen in dieser Lösung wird er an der Luft getrocknet und mit einem empfindlichen Monitor bzw. durch Auflegen eines Röntgenfilmes überprüft, ob die radioaktive Probe vollständig entfernt ist. Der Filter wird, wie oben beschrieben, erneut vorhybridisiert.

6.11 Nachweis von Plasmid-DNA in *Dictyostelium discoideum*

6.11.1 Plasmidpräparation

Alkalische SDS-Preparationen wurden, wie in 6.7.1 beschrieben, durchgeführt.

6.11.2 Isolierung eines rohen DNA-Extraktes zur "Koloniehybridisierung" (Firtel, pers. Mitt.)

$\sim 10^8$ Zellen werden in 1ml TE aufgenommen, SDS zu 1% zugegeben, gemischt und mit Phenol-Chloroform ausgeschüttelt, die DNA in der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt und in einem kleinen Volumen TE pH7.5 oder $0.2\text{M NaOH}/5\text{mM EDTA}$ aufgenommen.

Dieser Extrakt wird zu einer Koloniehybridisierung verwendet. Es handelt sich dabei um eine Modifikation der bei Bakterien verwendeten Methode zur Koloniehybridisierung (Grunstein & Hogness, 1975). Mit *D. discoideum* ist es nicht möglich, einen Abklatsch direkt von der Platte zu machen, da der DNA-Gehalt nicht hoch genug ist, bzw. die Zellen zu viele störende Bestandteile enthalten, die die DNA für die Hybridisierung nicht zugänglich machen.

$100\mu\text{l}$ des rohen DNA-Extrakts in $0.2\text{N NaOH}/5\text{mM EDTA}$ werden 30min bei 65°C inkubiert, $15\mu\text{l}$ $1\text{M NaAc pH}4$, $20\mu\text{l}$ $1.2\text{M Phosphatpuffer}$ und $70\mu\text{l}$ $20 \times \text{SSC}$ zugegeben und gemischt. Die Probe kann direkt oder mittels eines "dot blotter" auf Nitrozellulose aufgetragen. Der dot blotter ist nach dem Modell einer Gewebekulturplatte aufgebaut, und durch die einzelnen Löcher kann eine DNA-Lösung auf einen Nitrozellulosefilter aufgetragen werden. Die Flüssigkeit wird mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der Filter wird anschließend - wie nach einem Southern Transfer - behandelt (s. 6.10.2).

6.11.3 In situ-Lyse-Gele (nach Eckhardt, 1978)

In einem 0,75% Agarosegel (TBE) wird ein ~2cm breiter Schacht, der sich über die ganze Gelbreite ausdehnt, ausgespart. In die Mitte dieses Schachtes wird ein Taschenformer (10x3mm/Schacht) plaziert und mit dem folgendem Agarosepuffer gefüllt: 0,75% Agarose in TBE, 2% SDS, 2mg/ml Pronase.

Die Zellen werden in 100µl Probenpuffer (4µg/ml RNase, 20% Ficoll, 0,01% Bromphenolblau in TBE) aufgetragen und 3h bei 10V/h und über Nacht bei 80V/h elektrophoretisiert.

6.12 Anzucht und Plasmid-Isolierung aus Bakterien

6.12.1 Lagerung

Bakterien werden als Lyophilisat oder bei -70°C in LB mit 7% DMSO gelagert (A. Noegel, pers. Mitt.).

6.12.2 Anzucht (Maniatis et al., 1982)

Die Anzucht erfolgt bei 37°C. Der gewünschte Bakterienstamm wird aus einer tiefgefrorenen Kultur auf der erforderlichen selektiven LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Die Platte kann bei 4°C aufbewahrt werden, und dient als Ausgangsmaterial für Übernachtskulturen (d.h. ein Bakterienklon wird in einem kleinen Volumen LB unter Schütteln bei 37°C angezogen). Zum Animpfen eines größeren Volumens können mehrere Klone bzw. eine Übernachtskultur benutzt werden.

6.12.3 Plasmidisolierung

6.12.3.1 Präparative Plasmidisolierung

Der gewünschte Bakterienstamm wird in mindestens 1l LB unter selektiven Bedingungen angezogen und in der stationären Phase geerntet. Die Bakterien werden 15 min bei 8500g abzentrifugiert.

Alkalische SDS-Methode (Birnboim and Doly, 1979)

Der Bakterienniederschlag aus einem 1l LB wird in 40ml Glucoselösung (50mM Glucose/25mM Tris pH 8,0/10mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, Lysozym zu einer Endkonzentration von ~2mg/ml zugegeben, gemischt und 30-40min bei 4°C unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Nach Zugabe von 80ml alkalischer-SDS Lösung wird kräftig gemischt, 5min auf Eis inkubiert, und 60ml 3M NaAc, pH 4,8 zugegeben, kräftig gemischt und 1h bei 4°C inkubiert. Die gefällten hochmolekularen Verbindungen werden 10min bei 8000g abzentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird mit 2

Volumen Ethanol gefällt, abzentrifugiert und das DNA-Präzipitat in TE aufgenommen.

"Boiling method" (Holmes & Quigley, 1981)

Der Bakterienniederschlag aus 1l LB wird, abhängig vom Volumen, in 35-70ml STET-Puffer aufgenommen und die Bakterien möglichst homogen resuspendiert, Lysozym zu einer Endkonzentration von $\sim 700\mu\text{g/ml}$ zugegeben und gemischt. Die Suspension wird über dem Bunsenbrenner zum Kochen gebracht und 40sek im kochendem Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert, anschließend 30min bei 12000g abzentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird mit Ammoniumacetat (Endkonzentration $\sim 1.7\text{M}$) und einem gleichen Volumen Isopropanol gefällt (10min bei -20°C), abzentrifugiert, der Niederschlag getrocknet und in TE aufgenommen.

Die Plasmid-DNA wird bei beiden Methoden über einen CsCl-Gradienten gereinigt (1g CsCl/ml DNA-Lösung mit $400\mu\text{g/ml}$ Ebr enthält, vgl. 6.7.2).

6.12.3.2 Minipräparationen

(nach der "boiling method" (Holmes & Quigley, 1981))

Eine große Bakterienkolonie oder der Bakterienniederschlag einer Übernachtskultur ($\sim 5\text{ml}$) werden in $350\mu\text{l}$ STET-Puffer aufgenommen und $25\mu\text{l}$ einer frisch angesetzten Lysozym-Lösung (10mg/ml) zugegeben und gemischt. Die Bakteriensuspension wird 40sek bei 100°C inkubiert, 10min in einer Eppendorfschüttelfuge zentrifugiert. Der Überstand, der $\sim 1-2\mu\text{g}$ Plasmid enthält, wird 30min bei 37°C mit RNase verdaut; anschließend mit NH_4Ac und Isopropanol gefällt (s.oben) und in TE aufgenommen. Die DNA wird auf einem Agarosegel geprüft.

6.13 Klonierung (Maniatis et al., 1982)

6.13.1 Ligation

Die zu ligierende DNA wird mit dem gewünschten Restriktionsenzym geschnitten, mit Ethanol gefällt und in $20\mu\text{l}$ Ligationreaktionsgemisch (66mM Tris pH 7.4, 5mM MgCl_2 , 5mM DTT, 1mM ATP, $10\mu\text{g/ml}$ BSA, 0.01-0.02 Einheiten T_4 -Ligase) aufgenommen. Das Gemisch inkubiert über Nacht bei 4°C . Kompetente E.coli-Stämme (s.u.) können mit der ligierten DNA transformiert werden.

6.13.2 Transformation (Mandel & Higa, 1970; Maniatis et al., 1982)

20ml LB werden mit E.coli (z.B. Stamm HB101) angeimpft und unter Schütteln inkubiert, bis sie eine Dichte von $\sim 1-2 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht haben. Sie werden 10min bei $\sim 5000\text{g}$ in der Kälte abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Bakterienniederschlag in 10ml 0.1M MgCl_2 aufgenommen, 20min

auf Eis inkubiert, erneut abzentrifugiert, in 5ml 50mM CaCl₂ resuspendiert, 20min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert und in 1ml 50mM CaCl₂ aufgenommen.

Die Zellen behalten Kompetenz, wenn sie über Nacht auf Eis zu inkubieren (Dagert & Ehrlich, 1979).

0,2ml der Bakteriensuspension werden zu 0,1ml DNA (aus Ligation) in kaltem 10mM Tris/HCl pH 7, 10mM MgCl₂, 10mM CaCl₂ gegeben, gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 40sek bei 42°C wird die Bakteriensuspension in 10ml LB verdünnt, 1h bei 37°C ohne und 1h mit Schütteln inkubiert. Aliquots werden auf selektiven Platten ausplattiert (5-15µg/ml Tetracyclin oder 25-50µg/ml Ampicillin). Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert.

6.14 RNA-Charakterisierung in Dictyostelium discoideum (Maniatis et al., 1982)

6.14.1 RNA-Isolierung (nach Jacobson 1976)

D. discoideum-Zellen werden angezogen und geerntet, wie in 6.6.6 bzw. 6.6.7 beschrieben. Für RNA-Präparationen werden die Zellen in der frühen logarithmischen Phase ($1-2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) geerntet.

Der Zellniederschlag wird in 50mM HEPES pH 7.5 aufgenommen. Die Zellkonzentration soll 10^8 Zellen/ml Zellsuspension nicht überschreiten. 10% SDS wird zu einer Endkonzentration von 0.5% und DEP (maximal 4 Wochen alt) zu 1% zugegeben. Dieses Gemisch wird kurz kräftig gemischt und anschließend das gleiche Volumen Phenol (gesättigt mit 50mM HEPES pH 7.5) zugegeben, die Emulsion 30sek stark geschüttelt, das gleiche Volumen Chloroform: Isoamylalkohol (25:1) zugegeben und nochmals 30sek stark gemischt. Die Phasen werden durch Zentrifugation bei 6000g getrennt. Die wäßrige Phase und Teile der Interphase werden in ein neues Röhrchen gegeben und weitere viermal mit Phenol/Chloroform: Isoamylalkohol extrahiert, wobei anfangs auch die Interphase extrahiert wird; danach wird die RNA mehrmals mit Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen, um ein salzfreies Präzipitat zu erhalten. Der luftgetrocknete RNA-Niederschlag wird in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen, und von einer Verdünnung die optische Dichte bestimmt. Eine OD₂₆₀-Einheit RNA entspricht 40µg.

Um cytoplasmatische RNA zu erhalten, werden D. discoideum-Zellen geerntet, mit Lysepuffer (Firtel & Lodish, 1973) lysiert und die Zellkerne abzentrifugiert, wie in 6.6.7.1 beschrieben. Der cytoplasmatische Überstand dient als Ausgangsmaterial. Die RNA-Isolierung wird, wie oben beschrieben, durchgeführt.

6.14.2 Auftrennung der RNA und Northern blot-Analyse (Lehrach et al., 1977; Maniatis et al., 1982)

Um ein Durchrutschen des Gels zu verhindern, wird zuerst etwas Polyacrylamidstoplösung zwischen die Glasplatten gegossen. Während die Stoplösung polymerisiert, wird 1.2% Agarose in Gelpuffer gelöst, auf $^{-60^{\circ}\text{C}}$ abgekühlt, deionisiertes Formaldehyd auf eine Endkonzentration von 6% zugegeben; damit erhält der Gelpuffer auch pH 7 wie der Laufpuffer.

10 μg RNA, gelöst in Wasser, werden mit dem entsprechenden Volumen 5x Probenpuffer gemischt, die Probe 5min bei 60°C erwärmt und in Eiswasser schnell abgekühlt. (Zur Orientierung und zusätzlichen Beschwerung kann der Probe 1/10 Volumen des Farbgemisches zugesetzt werden). Die Proben werden sofort auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 50V/h durchgeführt. Nach $\sim 1000\text{V}$ ist das Bromphenolblau am unteren Rand des Geles angelangt.

Ein Teil des Gels wird weggeschnitten, 5min gewässert, anschließend in Laufpuffer mit 0.5mg/ml Ethidiumbromid angefärbt. Die ribosomalen RNA-Banden werden nach 1-2 Stunden sichtbar. Sie dienen zur Molekulargewichtsbestimmung. Die 26S- entspricht 4.2kbp, die 17S-rRNA 1.9kb.

Für den Transfer der RNA (Northern transfer) wird das unangefärbte Gel 5min gewässert, ein gleiches Volumen 20xSSC zugegeben, kurz gemischt und weitere 5min inkubiert. Da ein Formaldehydgel ein denaturierendes Gel darstellt, ist keine weitere Vorbehandlung erforderlich. Die RNA kann gleich auf Nitrozellulose transferiert werden. Die Analyse wird analog zum Southern blot (s. 6.10) durchgeführt.

6.15. Elektronenmikroskopische Analyse von Plasmid-DNA (Ferguson & Davis, 1978; Fisher et al., 1978)

Als Träger für die DNA werden Kupfernetzchen (Balzers Union), die mit einem Kollodiumfilm (Nitrozelluloselösung in Amylacetat, 1% bzw 4%, Polysciences) versehen sind, verwendet. Gereinigte DNA (CsCl-gereinigt oder Spermin-gefällt) in verschiedenen Verdünnungsstufen wird in folgendem Lösungsgemisch aufgenommen: 50 μl DNA-Lösung in TE, 50 μl Cytochrom c (Sigma) (1mg/ml in 0.5M NH_4Ac , pH 5), 400 μl 0.5M NH_4Ac , pH 5. Ein Tropfen dieser Lösung wird auf einen Objekträger, der rampenartig in einer Petrischale (gefüllt mit 0.1M NH_4Ac , pH 5) angeordnet ist, aufgetragen und rollt auf dem Objektträger herunter; die DNA-Lösung breitet sich auf der Hypophase aus. Ein befilmtes Kupfernetzchen wird in unmittelbarer Nähe des Punktes, an dem das DNA-Cytochrom c - Gemisch auf die Hypophase auftraf, kurz auf die Oberfläche der Hypophase getaucht. Die Netzchen werden 30sek in 50mM Uranylacetat positiv kontrastiert. Das Uranylacetat wird in 90% Ethanol frisch angesetzt, ausgehend von einer 50mM Uranylacetatvorratslösung in 50mM HCl. (Das Ethanol wird vor Gebrauch frisch destilliert.) Nach der Positivkontrastierung

werden die Netzen in 90% Ethanol gewaschen.

Die Proben werden in Vakuum mit Kohle-Platin schrägbedampft (Winkel 7.5°) und im Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

Die Konturlänge der Plasmid-DNA wird ausgemessen und mit einer Kontrolle korreliert.

7 Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K. & Watson, J.D. (1983). Molecular biology of the cell. *Garland Publ., Inc., New York*.

Alexander, S., Shinnick, T.M. & Lerner, R.A. (1983). Mutants of Dictyostelium discoideum blocked in expression of all members of the developmentally regulated discoidin multigene family. *Cell*, **34**, 467-475.

Anziano, P.Q., Perlman, P.S., Lang, B.F. & Wolf, K. (1983). The mitochondrial genome of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Curr. Gen.*, **7**, 273-284.

Ausubel, F.M. (1982). Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation. *Cell*, **29**, 1-2.

Bachhofen, V., Schweyen, R.J., Wolf, K. & Kaudewitz, F. (1972). Quantitative selection of respiratory deficient mutants in yeast by triphenyltetrazoliumchloride. *Zeitschr. f. Naturf.*, **27**, 252-256.

Barclay, S.L. & Meller, E. (1983). Efficient transformation in Dictyostelium discoideum amebas. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2117-2130.

Barton, J.K. & Lippard, S.J. (1980). Heavy metal interactions with nucleic acids. In: Spiro, T.G. (ed.). *Metal ions in biology*, Wiley & Sons, New York, 31-113.

Beach, L.R., & Palmiter, R.D. (1981). Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium-resistant mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2110-2114.

Bevan, M.W. & Chilton, M.-D. (1982). T-DNA of the Agrobacterium TI and RI Plasmids. *Ann. Rev. Genet.*, **16**, 357-384.

Birnboim, H.C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.

Blackburn, E.H. & Gall, J.G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J. Mol. Biol.*, **120**, 33-53.

Blumberg, D.D. & Lodish, H.F. (1980). Complexity of nuclear and polysomal RNAs in growing Dictyostelium discoideum cells. *Dev. Biol.*, **78**, 268-284.

Bonner, J.T. (1947). Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold, Dictyostelium discoideum. *J. Exp. Zool.*, **106**, 1-26.

- Bonner, J.T. (1949). The demonstration of acrasin in the later stages of the development of the slime mold Dictyostelium discoideum. *J. Exp. Zool.*, **110**, 259-271.
- Bonner, J.T. (1967). The cellular slime molds. *Princeton University Press, Princeton, New Jersey*, 2nd ed..
- Boy-Marcotte, E. & Jacquet, M. (1982). A Dictyostelium discoideum fragment complements Saccharomyces cerevisiae ura3 mutant. *Gene*, **20**, 433-440.
- Brefeld, O. (1869). Dictyostelium mucoroides. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abh. Senckenberg. Naturforsch. Ges.*, **7**, 85-107.
- Brefeld, O. (1884). Polysphondylium violaceum und Dictyostelium mucoroides nebst Bemerkungen zur Systematik der Schleimpilze. *Untersuch. Gesamtgeb. Mykol.*, **6**, 1-34.
- Broach, J.R. (1981). The yeast 2μ circle. In: Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach, J.R. (eds.). *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor, New York, 445-470.
- Calabretta B., Robberson, D.L., Barrera-Sablana, H.A., Lambreu, T.P. & Saunders, G.F. (1982). Genome instability in a region of human DNA enriched in Alu repeat sequences. *Nature*, **296**, 219-225.
- Cameron, J.R., Philippsen, P. & Davis, R.W. (1977). Analysis of chromosomal integration and deletions of yeast plasmids. *Nucl. Acids Res.*, **4**, 1429-1448.
- Casse, F., Boucher, C., Julliot, J.S., Michel, M. & Denarie, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, **113**, 229-242.
- Cech, T.R. & Brehm, S.L. (1981). Replication of the extrachromosomal ribosomal RNA genes of Tetrahymena thermophila. *Nucl. Acids Res.*, **9**, 3531-3543.
- Charlesworth, M.C. & Parish, R.W. (1975). The isolation of nuclei and basic nucleoproteins from the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *Eur. J. Biochem*, **54**, 307-316.
- Chung, S., Zucker C., & Lodish, H.F. (1983). A repetitive and apparently transposable DNA sequence in Dictyostelium discoideum associated with developmentally regulated RNAs. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 4835-4852.
- Clark-Walker, G.D. & Azad, A.A. (1980). Hybridizable sequences between cytoplasmic ribosomal RNAs and 3 micron circular DNAs of Saccharomyces cerevisiae and Torulopsis glabrata. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 1009-1022.

Clewell, D., & Helinski, D.R. (1969). Supercoiled circular DNA-Protein complex in Escherichia coli: Purification and induced conversion to an open circular DNA-Form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **62**, 1159-1166.

Cockburn, A.F., Taylor, W.C. & Firtel, R.A. (1978). Dictyostelium rDNA consists of non-chromosomal palindromic dimers containing 5S and 36S coding regions. *Chromosoma (Berl.)*, **70** 19-29.

Cocucci, S. & Sussman, M. (1970). RNA in cytoplasmic and nuclear fractions of cellular slime mold amebas. *J. Cell Biol.*, **45**, 399-407.

Colman, A., Byers, M.J., Primrose, S.B. & Lyons, A. (1978). Rapid Purification of plasmid DNAs by hydroxyapatite chromatography. *Eur. J. Biochem*, **91**, 303-310.

Cotter, D.A., Garnish, F.J. & Tisa, L.S. (1979). The physiological effects of restrictive environmental conditions on Dictyostelium discoideum spore germination. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 24-31.

Currier, T.C. & Nester, E.W. (1976). Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.*, **76**, 431-441.

Dagert, M. & Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of E.coli cells. *Gene*, **6**, 23-28.

Davidson, E.H., Hough, B.R. Klein, W.H. & Britten, R.J. (1975). Structural genes adjacent to interspersed repetitive DNA sequences. *Cell*, **4**, 217-238.

Davies, J. & Smith, D.I. (1978). Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 469-518.

Deering, R.A., Smith, M.S., Thompson, B.K. & Adolf, A.C. (1970). Gamma-ray-resistant and -sensitive strains of slime mould (Dictyostelium discoideum). *Radiation Res.*, **43**, 711-728.

Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J., & Hartman, P. (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics*, **54**, 61-76.

Dougan, G., Saul, M., Warren, G. & Sherratt, D. (1978). A functional map of plasmid ColE1. *Mol. Gen. Genetics*, **158**, 325-327.

Dottin, R.P., Weiner, A.M. & Lodish, H.F. (1976). 5' terminal nucleotide sequences of the messenger RNAs of Dictyostelium discoideum. *Cell*, **8**, 233-244.

Drummond, M. (1979). Crown gall disease. *Nature*, **281**, 343-347.

Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, **1**, 584-588.

Emery, H.S. & Weiner, A.M. (1981). An irregular satellite sequence is found at the termini of the linear extrachromosomal rDNA in Dictyostelium discoideum. *Cell*, **26**, 411-419.

Engberg, J., Andersson, P., Leick, V. & Collins, J. (1976). Free ribosomal DNA molecules from Tetrahymena pyriformis GL are giant palindromes. *J. Mol. Biol.*, **104**, 455-470.

Erdos, G.W., Raper, K., & Vogen, L.K. (1973). Mating types and macrocyst formation in Dictyostelium discoideum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1828-1830.

Esser, K., Kück, U., Stahl, U. & Tudzynski, P. (1983). Cloning vectors of mitochondrial origin for eukaryotes: a new concept in genetic engineering. *Curr. Gen.*, **7**, 239-243.

Erhart, E. & Hollenberg, C.P. (1981). Curing of Saccharomyces cerevisiae 2µm DNA by transformation. *Curr. Gen.*, **3**, 83-89.

Ferguson, J., & Davis, R.W. (1978). Quantitative electron microscopy of nucleic acids. In: Koehler, J.K. (ed.). *Advanced techniques in biological electron microscopy II*, Springer Verlag, Berlin, 123-171.

Ferris, P.J., Vogt, V.M. & Truitt C.L. (1983). Inheritance of extrachromosomal rDNA in Physarum polycephalum. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 635-642.

Firtel, R.A. & Bonner, J. (1972). Characterization of the genome of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *J. Mol. Biol.*, **66**, 339-361.

Firtel, R.A. & Lodish, H.F. (1973). A small nuclear precursor of messenger RNA in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *J. Mol. Biol.*, **79**, 295-314.

Fisher, P.R., Appleton J. & Pemberton, J.M. (1978). Isolation and characterisation of the pesticide-degrading plasmid pJP1 from Alcaligenes paradoxus. *J. Bacteriol.* **135**, 798-804.

Fisher, P.R., Smith, E. & Williams, K.L. (1981). An extracellular signal controlling phototactic behavior by D.discoideum slugs. *Cell*, **23**, 799-807.

Fisher, P.R. & Williams, K.L. (1982). Thermotactic behaviour of Dictyostelium discoideum slug phototaxis mutants. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 965-971.

Flavell, A.J., & Ish-Horowicz, D. (1981). Extrachromosomal circular copies of the eukaryote transposable element *copia* in cultured Drosophila cells. *Nature*, 292, 591-595.

Fogel, S. & Welch, J.W. (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5342-5346.

Fogel, S., Welch, J.W., Cathala, G. & Karin, M. (1983). Gene amplification in yeast: CUP1 copy number regulates copper resistance. *Curr. Gen.*, 7, 347-355.

Franke, J., & Kessin, R. (1977). A defined minimal medium for axenic strains of Dictyostelium discoideum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2157-2161.

Franke, J., Kessin, R. (1978). Auxotrophic mutants of Dictyostelium discoideum. *Nature*, 272, 537-538.

Fukuhara, H., (1982) Restriction map and gene organization of the mitochondrial DNA from Dictyostelium discoideum. *Biol. Cell*, 46, 321-324

Gaillardin, C., Fournier, P., Budar, F., Kudla, B., Gerbaud, C. & Heslot, H. (1983). Replication and recombination of 2- μ DNA in Schizosaccharomyces pombe. *Curr. Gen.*, 7, 245-253.

Gerisch, G. (1961). Zellkontaktbildung vegetativer und aggregationsreifer Zellen von Dictyostelium discoideum. *Naturwissenschaften*, 48, 436-437.

Gerisch, G. (1964). Entwicklung von Dictyostelium. *Institut für den wissenschaftlichen Film, Göttingen*.

Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A. & Wick, U. (1975). Control of cell-contact sites by cyclic AMP pulses in differentiating Dictyostelium discoideum cells. *Nature*, 255, 547-549.

Goebel, W. (1973). Extrachromosomale DNA in Bakterien. *Angew. Chemie*, 85, 569-580.

Guardiola, J., Grimaldi, G., Costantino, P., Micheli, G., & Cervone, F. (1982). Loss of nitrofurantoin resistance in Fusarium oxysporum is correlated with loss of a 46.7 kb circular DNA molecule. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 2235-2242.

Gross, J.D., Town, C.D., Brookman, J.J., Jermyn, K.A., Peacey, M.J. and Kay, R.R. (1981). Cell patterning in Dictyostelium. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 295, 497-508.

Grunstein, M. & Hogness, D.S. (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3961-3965.

Häder, D.P., Williams, K.L., Fisher, P.R. (1983).

- Phototactic orientation by amoebae of Dictyostelium discoideum slug phototaxis mutants. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1617-1621.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of E.coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hinnen, A., Hicks, J.B. & Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1929-1933.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.*, **26**, 365-369.
- Hirth, K.-P., Edwards, C.A. & Firtel, R.A. (1982). A DNA-mediated transformation system for Dictyostelium discoideum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7356-7360.
- Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, **114**, 193-197.
- Hong, C.B., Häder, D.P. & Poff, K.L. (1981). Phototaxis in Dictyostelium discoideum amoebae. *Photochem. Photobiol.*, **33**, 373-378.
- Hong, C.B., Fontana, D.R. & Poff, K.L. (1983). Thermotaxis of Dictyostelium discoideum amoebae and its possible role in pseudoplasmodial thermotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5646-5649.
- Hoopes, B.C., & McClure, W.R. (1981). Studies on the selectivity of DNA precipitation by spermine. *Nucl. Acids Res.*, **9**, 5493-5504.
- Hori, H., Osawa, S. & Iwabuchi, M. (1980). The nucleotide sequence of 5S rRNA from a cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 5535-5539.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.
- Ivatt, R.J., Prem Das, O., Henderson, E.J. & Robbins, P.W. (1981). Developmental regulation of glycoprotein biosynthesis in Dictyostelium. *J. Supramol. Struct. & Cell Biochem.*, **17**, 359-368.
- Jacobson, A., Firtel, R.A. & Lodish, A.F. (1974). Synthesis of messenger and ribosomal RNA precursors in isolated nuclei of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *J. Mol. Biol.*, **82**, 213-230.
- Jacobson, A. (1976). Analysis of messenger RNA transcription in Dictyostelium discoideum or slime mold messenger RNA: how to find it and what to do with it once you have got it. In: Last, J.A. (ed). *Methods in Molecular Biology*. Marcel Dekker

Inc., New York, 8, 161-209.

Jacquet, M., Boy-Marcotte, E., Rossier, C., Kessin, R.H. (1982). A fragment of Dictyostelium discoideum genomic DNA that complements the ura1 mutation of Saccharomyces cerevisiae. *J. Mol. Appl. Gen.*, **1**, 513-525.

Jacquet, M., Part, D. & Felenbok, B. (1981). Changes in the polyadenylated messenger RNA population during development of Dictyostelium discoideum. *Dev. Biol.*, **81**, 155-166.

Jayaram, M., Li, Y.-Y. & Broach, J.R. (1983). The yeast plasmid 2 μ circle encodes components required for its high copy propagation. *Cell*, **34**, 95-104.

Kägi, J.H.R. & Nordberg, M. (1979). Methallothionein. *Birkhäuser, Basel*.

Karrer, K.M. & Gall, J.G. (1976). The macronuclear ribosomal DNA of Tetrahymena pyriformis is a palindrome. *J. Mol. Biol.*, **104**, 421-453.

Katz, E.R., & Sussman, M. (1972). Parasexual recombination in Dictyostelium discoideum: selection of stable diploid heterozygotes and stable haploid segregants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 495-498.

Kimmel, A.R., & Firtel, R.A. (1982). The organization and expression of the Dictyostelium genome. In: Loomis, W.F. (ed.). *The development of Dictyostelium discoideum*. *Acad. Press, New York*, 233-324.

Kindle, K.L. & Firtel, R.A. (1978). Identification and analysis of Dictyostelium actin genes, a family of moderately repeated genes. *Cell*, **15**, 763-778.

Konijn, T.M., van de Meene, J.G.C., Bonner, J.T. & Barkley, D.S. (1967). The acrasin activity of adenosine-3',5-cyclic phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1152-1154.

Kück, U., Stahl, U., & Esser, K. (1981). Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in Podospora anserina. *Curr. Genet.*, **3**, 151-156.

Lagarias, J.C., Vierstra, R.D., Poff, K.L. (1983). Protoporphyrin in amoebae of Dictyostelium discoideum. I. Isolation and Characterisation. *Photochem. Photobiol.*, im Druck.

Larionov, V.L., Grishin, A.V. & Smirnov, M.N. (1980). 3 μ m DNA - an extrachromosomal ribosomal DNA in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Gene*, **12**, 41-49.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical

- examination. *Biochemistry*, **16**, 4743-4751.
- Lewin, R. (1982). Can genes jump between eukaryotic species? *Science*, **217**, 42-43.
- Li, Y. et al., (in Vorbereitung). Restriction endonuclease mapping of pTW16 plasmid.
- Lodola, A. (1981). Effects of cobalt chloride on haem synthesis in isolated hepatocytes. *FEBS Letters*, **123**, 137-140.
- Loening, U.E. (1969). The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* **113**, 131-138.
- Loomis, W.F. (1971). Sensitivity of Dictyostelium discoideum to nucleic acid analogues. *Exptl. Cell Res.* **64**, 484-486.
- Loomis, W.F. (ed) (1982). The development of Dictyostelium discoideum. *Acad. Press, New York*.
- MacLeod, C., Firtel, R.A. & Papkoff, J. (1980). Regulation of actin gene expression during spore germination in Dictyostelium discoideum. *Dev. Biol.*, **76**, 263-274.
- Maeda, Y. (1983). Axenic growth of Dictyostelium wild-type NC-4 cells and its relation to endocytotic ability. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2467-2473.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 154-162.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.
- McArthur, C.R. & Clark-Walker, G.D. (1983). Mitochondrial DNA size diversity in the Dekkera/Brettanomyces yeasts. *Curr. Gen.*, **7**, 29-35.
- McKeown, M. & Firtel, R.A. (1981a). Differential expression und 5'end mapping of actin genes in Dictyostelium. *Cell*, **24**, 799-807.
- McKwown, M & Firtel, R.A. (1981b). Evidence for subfamilies of actin genes in Dictyostelium as determined by comparisons of 3'end sequences. *J. Mol. Biol.*, **151**, 593-606.
- McMaster, G.K., Samulski, R.J., Stein, J.L. & Stein, G.S. (1980). Rapid purification of covalently closed circular DNAs of bacterial plasmids and animal tumor viruses. *Anal. Biochem.*, **109**, 47-54.
- Mehdy, M.C., Ratner, D. & Firtel, R.A. (1983). Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in Dicty-

ostelium discoideum. *Cell*, **32**, 763-771.

Metz, B.A., Ward, T.E., Welker, D.L., & Williams, K.L. (1983). Endogenous plasmid in Dictyostelium discoideum. In: Nagley, P., Linanne, A.W., Peacock, W.J., & Pateman, J.A. (eds.). *Manipulation and expression of genes in eukaryotes*. Academic Press, Sydney, 179-183.

Metz, B.A., Ward, T.E., Welker, D.L. & Williams, K.L. (1983). Identification of an endogenous plasmid in Dictyostelium discoideum. *EMBO J.*, **2**, 515-519

Mobley, H.L.T., & Rosen, B.P. (1982). Energetics of plasmid-mediated arsenate resistance in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6119-6122.

Morrissey, J.H. (1983). Deficiency in homogentisic acid oxidase activity associated with the brown phenotype in Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1127-1132.

Müller, K., Gerisch, G., Fromme, I., Mayer, H. & Tsugita, A. (1979). A membrane glycoprotein of aggregating Dictyostelium discoideum cells with the properties of contact sites. *Eur. J. Biochem.*, **99**, 419-426.

Neuberger, M.S. & Hartley, B.S. (1980). Minicircular ColE1-related DNA in strains of Klebsiella aerogenes selected for fast growth on xylitol. *J. Gen. Microbiol.*, **118**, 171-177.

Newell, P.C. (1978). Genetics of the cellular slime molds. *Ann. Rev. Genet.*, **12**, 69-93.

Newell, P.C. (1982). Genetics. In: Loomis, W.F. (ed.). *The development of Dictyostelium discoideum*. Acad. Press, New York, 35-70.

Newell, P.C., Henderson R.F., Mosses, D. & Ratner, D.I. (1977). Sensitivity to Bacillus subtilis: a novel system for selection of heterozygous diploids of Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.*, **100**, 207-211.

Newell, P.C. & Ross, F.M. (1982). Inhibition by adenosine of aggregation centre initiation and cyclic AMP binding in Dictyostelium. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 2715-2724.

Newell, P.C., Telser, A. & Sussman, M. (1969). Alternative developmental pathways determined by environmental conditions in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *J. Bacteriol.*, **100**, 763-768.

North, M.J. & Williams, K.L. (1978). Relationship between the axenic phenotype and sensitivity to omega amino carboxylic acids in Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.*, **107**, 223-230.

- Olive, L.S. (1975): The mycetozoans, *Academic Press, New York*.
- Orlowski, M. & Loomis, W.F. (1979). Plasma membrane proteins of Dictyostelium: The spore coat proteins. *Dev. Biol.*, **71**, 297-307.
- O'Brien, S.J. (ed.) (1982). Genetic maps, volume 2. *Laboratory of Viral Carcinogenesis, National Institutes of Health; Frederick, Maryland 21701, USA*, 182-185.
- Okamoto, K. (1981). Differentiation of Dictyostelium discoideum cells in suspension culture. *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 301-308.
- Palatnik, C.M., Storti, R.V. & Jacobson, A. (1979). Fractionation and functional analysis of newly synthesized and decaying messenger RNAs from vegetative cells of Dictyostelium discoideum. *J. Mol. Biol.*, **128**, 371-395.
- Peffley, D.M. & Sogin, M.L. (1981). A putative tRNA trp gene cloned from Dictyostelium discoideum: its nucleotide sequence and association with repetitive deoxyribonucleic acid. *Biochem.*, **20**, 4015-4021.
- Pellcuer, M., Galzy, P & Pasero, J. (1971) Use of mutations in marking industrial yeast strains. *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.*, **18**, 253-259.
- Podgorski, G.J. (1983). Thymidine requiring mutants of Dictyostelium discoideum. *PhD Thesis, Pennsylvania State University, USA*.
- Poff, K.L. & Whitaker (1979). Movement of slime molds. In: Haupt, W. & Feinlab, M.E. (eds). *Encyclopedia of plant physiology. Physiology of movement*. Springer Verlag, Berlin, **7**, 355-382.
- Poole, S.J. & Firtel, R.A. (1983). Genomic instability and mobile genetic elements in regions surrounding two discoidin I genes of Dictyostelium discoideum, *in Druck*.
- Rahmsdorf, H.J. (1977). A defined, synthetic growth medium for Dictyostelium discoideum, strain Ax-2. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 527-529.
- Raper, K.B. (1935). Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res. (Wash.)*, **50**, 135-147.
- Raper, K.B. (1937). Growth and development of Dictyostelium discoideum with different bacterial associates. *J. Agr. Res. (Wash.)*, **58**, 289-316.
- Raper, K.B. (1951). Isolation, cultivation and conservation of simple slime molds. *Quart. Rev. Biol.*, **26**, 169-190.

Ratner, D.I., Ward, T.E. & Jacobson, A. (1981). Evidence for the transformation of Dictyostelium discoideum with homologous DNA. In: Brown, D. & C.F. Fox (eds). *Developmental biology using purified genes. ICN-UCLA Symposia on Mol. & Cell. Biol., Acad. Press, New York*, 23, 595-605.

Razin, A. & Riggs, A.D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science*, 210, 604-610.

Reinhardt, D.J. (1966). Silica gel as a preserving agent for the cellular slime mold Acrasis rosea. *J. Protozool.*, 13, 225-226.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., & Berg, P. (1977). Labeling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.

Robson, G.E. & Williams, K.L. (1977). The mitotic chromosomes of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum: a karyotype based on giemsa banding. *J. Gen. Microbiol.*, 99, 191-200.

Robson, G.E. & Williams, K.L. (1979). Vegetative incompatibility and the mating-type locus in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *Genetics*, 93, 861-875.

Robson, G.E. & Williams, K.L. (1980). The mating system of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *Curr. Genetics*, 1, 229-232.

Robson, G.E. & Williams, K.L. (1981). Quantitative analysis of macrocyst formation in Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.*, 125, 463-467.

Rosen, E., Sivertsen, A. & Firtel, R.A. (1983). An unusual transposon encoding heat shock inducible and developmentally regulated transcripts in Dictyostelium. *Cell*, 35, 243-251.

Röwekamp, W., Poole, S, Firtel, R.A. (1980). Analysis of the multigene family coding the developmentally regulated carbohydrate binding protein discoidin I in Dictyostelium discoideum. *Cell*, 20, 495-505.

Röwekamp, W. & Firtel, R.A. (1980). Isolation of developmentally regulated genes from Dictyostelium. *Dev. Biol.*, 79, 409-418.

Ruvkun, G.B. Sundaresan, V. & Ausubel, F.M. (1982). Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of Rhizobium meliloti symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell*, 29, 551-559.

Sherratt, D.J. (1982). The maintenance and propagation of plasmid genes in bacterial populations. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 655-661.

- Silver, S., & Keach, D. (1982). Energy dependent arsenate efflux; the mechanism of plasmid-mediated resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6114-6118.
- Sinclair, J.H., Sang, J.H., Burke, J.F. & Ish-Horowicz, D. (1983). Extrachromosomal replication of copia-based vectors in cultured Drosophila cells. *Nature*, **306**, 198-200.
- Sinclair, P., Gibbs, A.H., Sinclair, J.F. & Matteis F. de. (1979). Formation of cobalt protoporphyrin in the liver of rats. *Biochem. J.*, **178**, 529-538.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Sternfeld, J. & David, C.N. (1981). Cell sorting during pattern formation in Dictyostelium. *Differentiation*, **20**, 10-21.
- Sternfeld, J. & David, C.N. (1982). Fate and regulation of anterior-like cells in Dictyostelium slugs. *Dev. Biol.*, **93**, 111-118.
- Stenhouse, F.O. & Williams, K.L. (1981). Investigation of cell patterning in the asexual fruiting body of Dictyostelium discoideum using haploid and isogenic diploid strains. *Differentiation*, **18**, 1-9.
- Stinchcomb, D.T., Thomas, M., Kelly, J., Selker, E. & Davis, R.W. (1980). Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4559-4563.
- Stohl, L.L., Collins, R.A., Cole, M.D. & Lambowitz, A.M. (1982). Characterization of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild-type Neurospora intermedia strains. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 1439-1458.
- Struhl, K. (1983). The new yeast genetics. *Nature*, **305**, 391-397.
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S., & Davis, R.W. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1035-1039.
- Summers, A.O., Silver, A. (1978). Microbial transformations of metals. *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 637-672.
- Sussman, M. (1966). Biochemical and genetic methods in the study of cellular slime mold development. In: Prescott, D. (ed). *Methods in cell physiology*, Acad. press, New York, **2**, 397-410.
- Sussman, M. (1982). Morphogenetic signaling, cytodifferen-

tiation and gene expression. In: Loomis, W.F.(ed.). *The development of Dictyostelium discoideum*. Acad. Press, New York, 353-385.

Sussman, R. & Rayner, E.P. (1971). Physical characterization of deoxyribonucleic acids in *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**, 127-137.

Sussman, R., & Sussman, M. (1967). Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 53-55.

Sutcliffe, J.G. (1978). pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucl. Acids Res.* **5**, 2721-2728.

Taylor, G.R., Barclay, B.J. Storms, R.K., Friesen, J.D. & Haynes, R.H. (1982). Isolation of the thymidylate synthetase gene (TMP1) by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 437-442.

Tudzynski, P. (1982). DNA Plasmids in eukaryotes with emphasis on mitochondria. *Progr. Bot., Springer Verlag, Berlin*, **44**, 297-307.

Tudzynski, P., Düvell, A., Esser, K. (1983). Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea*. I. Mitochondrial DNA and mitochondrial plasmids. *Curr. Gen.*, **7**, 145-150.

Turner, R., North, M.J. & Harwood, J.M. (1979). Putrescine uptake by the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.*, **180**, 119-127.

Ushiba, D. & Magasanik, B. (1952). Effects of auxotrophic mutations on the adaption to inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **80**, 626-632.

Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J. Ammerer, G. & Hall, B.D. (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, **298**, 347-350.

van Tieghem, P.(1880). Sur quelques myxomycetes a plasmode agrege. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **27**, 317-322.

Voet L., Krefft M., Brüderlein M., & Williams K.L. Flow cytometer study of anterior like cells in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, eingereicht.

Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H., Steinhart, R. (1980). Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J. Cell Biol.*, **86**, 456-465.

Vogt, V.M. & Braun, R. (1976). Structure of the ribosomal

- DNA in Physarum polycephalum. *J. Mol. Biol.*, **106**, 567-587.
- Vogt, V.M. & Braun, R. (1977). The replication of ribosomal DNA in Physarum polycephalum. *Eur. J. Biochem.*, **80**, 557-566.
- Wallace, M.A. & Raper, K.B., (1979). Genetic exchanges in the macrocysts of Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.*, **113**, 327-338.
- Watts, D.J. & Ashworth, J.M. (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem J.* **119**, 171-174.
- Weeks, G. & Ashworth, J.M. (1972). Glycogen synthetase and the control of glycogen synthesis in the cellular slime mould Dictyostelium discoideum during the growth (myxamoebael) phase. *Biochem. J.* **126**, 617-626.
- Weijer, C.J., Duschl, G. & David, C.N. (1984). A revision of the Dictyostelium discoideum cell cycle. Im Druck.
- Weinkauff, A.M. & Filosa, M.F. (1965). Factors involved in the formation of macrocysts by the cellular slime mold, Dictyostelium mucoroides. *Can. J. Microbiol.*, **11**, 385-387.
- Welker, D.L., Metz, B.A. & Williams, K.L. (1982). Chromosome rearrangements in Dictyostelium discoideum. *Genetics*, **102**, 711-723.
- Welker, D.L. & Williams, K.L. (1980a). The assignment of four new loci including the coumarin sensitivity locus couA to linkage group VII of Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.* **120**, 149-159.
- Welker, D.L. & Williams, K.L. (1980b). Bacillus subtilis sensitivity loci in Dictyostelium discoideum. *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 179-183.
- Welker, D.L. & Williams, K.L. (1980c). Mitotic arrest and chromosome doubling using thiabendazole, cambendazole, nocadazole and benlate in the slime mould Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.*, **116**, 397-407.
- Welker, D.L. & Williams, K.L. (1981). Genetic and cytological characterisation of fusion chromosomes of Dictyostelium discoideum. *Chromosoma (Berl.)*, **82**, 321-332.
- Welker, D.L. & Williams, K.L. (1982a) A genetic map of Dictyostelium discoideum based on mitotic recombination. *Genetics*, **102**, 691-710.
- Welker, D.L. & Williams, K.L. (1982b). Genetic analysis and phenotypic characterization of effects on the cytoskeleton of coumarin-sensitivity mutations in Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1329-1343.

Wiener, E. & Ashworth, J.M. (1970). The isolation and characterization of lysosomal particles from myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *Biochem. J.*, **118**, 505-512.

Williams J.G., Lloyd, M.M. (1979). Changes in the abundance of polyadenylated RNA during slime mold development measured using cloned molecular hybridization probes. *J. Mol. Biol.*, **129**, 19-35.

Williams, K.L. (1976). Isolation of strains of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum capable of growing after a single passage in axenic medium. *Appl. Envir. Microbiol.* **32**, 635-637.

Williams, K.L. (1978). Characterization of dominant resistance to cobalt chloride in Dictyostelium discoideum and its use in parasexual genetic analysis. *Genetics*, **90**, 37-47.

Williams, K.L. (1980): Examination of the chromosomes of Polysphondylium pallidum following metaphase arrest by benzimidazole derivatives and colchicine. *J. Gen. Microbiol.*, **116**, 409-415.

Williams, K.L., Kessin, R.H. & Newell, P.C. (1974). Parasexual genetics in Dictyostelium discoideum: mitotic analysis of acriflavin resistance and growth in axenic medium. *J. Gen. Microbiol.* **84**, 59-69.

Williams, K.L., & Newell, P.C. (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mould Dictyostelium discoideum using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307.

Williams, K.L. Robson, G.E. & Welker, D.L. (1980). Chromosome fragments in Dictyostelium discoideum obtained from parasexual crosses between strains of different genetic background. *Genetics*, **95**, 289-304.

Williams, K.L. & Welker, D.L. (1980). Mutations specific to spore maturation in the asexual fruiting body of Dictyostelium discoideum. *Dev. Gen.*, **1**, 355-362.

Wong, T.K. & Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **107**, 584-587.

Wright, M.D., Williams, K.L., Newell, P.C. (1977). Ethidium bromide resistance: a selective marker on linkage group IV of Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.*, **102**, 423-426.

Wright, R.M. & Cummings, D. J. (1983). Transcription of a mitochondrial plasmid during senescence in Podospora anserina. *Curr. Gen.*, **7**, 457-464.

Yao, M.C. & Gall, J.G. (1977). A single integrated gene for ribosomal RNA in a eucaryote, Tetrahymena pyriformis. *Cell*, 12, 121-132.

Yeats, S., McWilliam, P. & Zillig, W. (1982). A plasmid in the archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius. *EMBO J.*, 1, 1035-1038.

Zada-Hames, I.M. & Ashworth, J.M. (1977). The cell cycle during the growth and development of Dictyostelium discoideum. In: Cappuccinelli, P. & Ashworth, J.M. (eds). *Developments in cell biology*, Elsevier / North-Holland, Amsterdam, 1, 69-78.

Zasloff, M., Ginder, G.D. & Felsenfeld, G. (1978). A new method for the purification and identification of covalently closed circular DNA molecules. *Nucl. Acids Res.*, 5, 1139-1152.

8 Appendix

8.1 Liste der Loci von Dictyostelium discoideum

Die auf den folgenden Seiten aufgeführte Liste der Loci und Genkarte wurde unverändert dem Buch "Genetic Maps" (O'Brien, 1982) entnommen. Ergänzungen, insbesondere zur Genkarte, sind in Welker & Williams, (1982a) zu finden.

Die genauen Literaturzitate von Referenz 15 und 30 sind in Kapitel 7, Literatur, aufgeführt.

Linkage Group	Gene Symbol	Mutant Phenotype	Reference
I	<u>acrB</u>	Growth in the presence of acriflavin (100ug/ml)	31
	<u>aggB</u>	Aggregation deficient	34
	<u>benA</u>	Growth in the presence of benlate (600ug/ml)	36
	<u>cadA</u>	Growth in the presence of cadmium sulfate (150ug/ml)	35
	<u>couB</u>	Sensitivity to coumarin (1.3mM)	30
	<u>cycA</u>	Growth in the presence of cycloheximide (500ug/ml)	8
	<u>devA</u>	Developmental mutation	21
	<u>matA</u>	Mating-type locus (also mata)	37
	<u>modA</u>	Alteration of glycosidase protein modification	6
	<u>radA</u>	Sensitive to U.V. and γ -irradiation	23
	<u>sprA</u>	Round spores	8
	<u>tsgE</u>	Temperature sensitive for growth	8
	<u>tsgI</u>	Temperature sensitive for growth	6
	<u>tsgL</u>	Temperature sensitive for growth	24
	<u>tsgQ</u>	Temperature sensitive for growth	30
II	<u>acra</u>	Growth with acriflavin (100ug/ml) or methanol (2%)	32
	<u>aggA</u>	Aggregation deficient	34
	<u>aggF</u>	Aggregation deficient	4
	<u>aggi</u>	Aggregation deficient	4
	<u>arsA</u>	Growth in the presence of Na arsenate (1.5mg/ml)	31
	<u>arsB</u>	Growth in the presence of Na arsenate (1.5mg/ml)	31
	<u>axeA</u>	Axenic growth (provided that axeB is present)	32
	<u>axeC</u>	Axenic growth (provided axeA and axeB are present)	17
	<u>cbpA</u>	Altered discoidin (CBP) protein	19
	<u>cltA</u>	Wide band of unaggregated amoebae in colony	33
	<u>couC</u>	Sensitivity to coumarin (1.3mM)	30
	<u>couE</u>	Sensitivity to coumarin (1.3mM)	30
	<u>couF</u>	Sensitivity to coumarin (1.3mM)	30
	<u>devB</u>	Developmental mutation	21
	<u>oaaa</u>	Sensitivity of development to -amino acids	17
	<u>radH</u>	Sensitive to U.V. and γ -irradiation	24
	<u>slgE</u>	Unable to develop beyond slug stage	15
	<u>stkA</u>	Differentiation only into stalk cells	13
	<u>stmB</u>	Formation of large aggregation streams	20
	<u>stmD</u>	Formation of large aggregation streams	20
	<u>sprB</u>	Long spores	14
	<u>tsgD</u>	Temperature sensitive for growth	8
	<u>tsgF</u>	Temperature sensitive for growth	21
	<u>tsgH</u>	Temperature sensitive for growth	6
	<u>tsgP</u>	Temperature sensitive for growth	13
	<u>whiA</u>	White spore mass	8

III	<u>acrC</u>	Growth in the presence of acriflavin (100ug/ml)	21
	<u>alpA</u>	Altered alkaline phosphatase activity	12
	<u>axeB</u>	Axenic growth (provided axeA is present)	32
	<u>bsgA</u>	Unable to grow on <i>Bacillus subtilis</i>	16
	<u>couD</u>	Sensitivity to coumarin (1.3mM)	30
	<u>radB</u>	Sensitivity to U.V. and γ -irradiation	23
	<u>radC</u>	Sensitive to U.V. irradiation	23
	<u>radE</u>	Sensitive to U.V. and γ -irradiation	5
	<u>radG</u>	Sensitive to U.V. and γ -irradiation	24
	<u>slgB</u>	Unable to develop beyond the slug stage	15
	<u>slgD</u>	Unable to develop beyond the slug stage	15
	<u>slgG</u>	Unable to develop beyond the slug stage	15
	<u>stmC</u>	Formation of large aggregation streams	20
	<u>stmE</u>	Formation of large aggregation streams	20
	<u>tsgA</u>	Temperature sensitive for growth	9
	<u>tsgC</u>	Temperature sensitive for growth	9
	<u>tsgJ</u>	Temperature sensitive for growth	3
	<u>tsgN</u>	Temperature sensitive for growth	37
	<u>tsgR</u>	Temperature sensitive for growth	30
	<u>whiB</u>	White spore mass	13

IV	<u>acrD</u>	Growth in the presence of acriflavin (100ug/ml)	29
	<u>aggJ</u>	Aggregation deficient	2
	<u>aggL</u>	Aggregation deficient	7
	<u>bwnA</u>	Formation of brown pigment	8
	<u>bsgC</u>	Unable to grow on <i>Bacillus subtilis</i>	26
	<u>ebrA</u>	Growth in the presence of ethidium bromide (35ug/ml)	38
	<u>ebrB</u>	Growth in the presence of ethidium bromide (35ug/ml)	25
	<u>frtA</u>	Spore mass tends to slide to base of fruiting body	27
	<u>minA</u>	Colonies grow very slowly on SM agar	33
	<u>nagA</u>	Altered N-acetylglucosaminidase activity	11
	<u>pdsA</u>	Deficient in phosphodiesterase	1
	<u>radD</u>	Sensitive to U.V. and γ -irradiation	24
	<u>radF</u>	Sensitive to u.v. and γ -irradiation	24
	<u>rdeA</u>	Rapid development	10
	<u>slgC</u>	Long delay at slug stage	15
	<u>slgI</u>	Unable to develop beyond slug stage	15
	<u>sprH</u>	Round spores	33
	<u>sprJ</u>	Spores fail to mature	36
	<u>tsgB</u>	Temperature sensitive for growth	9
	<u>whiC</u>	White spore mass	13

V

VI	<u>gluA</u>	Altered β -glucosidase activity	11
	<u>manA</u>	α -mannosidase-1 deficient	6
	<u>stlA</u>	Deficient in stalk formation	13

VII	<u>bsgB</u>	Unable to grow on <i>Bacillus subtilis</i>	13
	<u>cobA</u>	Growth with cobaltous chloride (300-360ug/ml)	18,27
	<u>couA</u>	Sensitivity to coumarin (1mM)	27
	<u>frtB</u>	Formation of aggregates in rings in clones on agar	27
	<u>slgJ</u>	Unable to develop beyond slug stage	15
	<u>stmA</u>	Formation of large aggregation streams	20
	<u>tsgC</u>	Temperature sensitive for growth	21,27
	<u>tsgK</u>	Temperature sensitive for growth	20
	<u>tsgM</u>	Temperature sensitive for growth	27

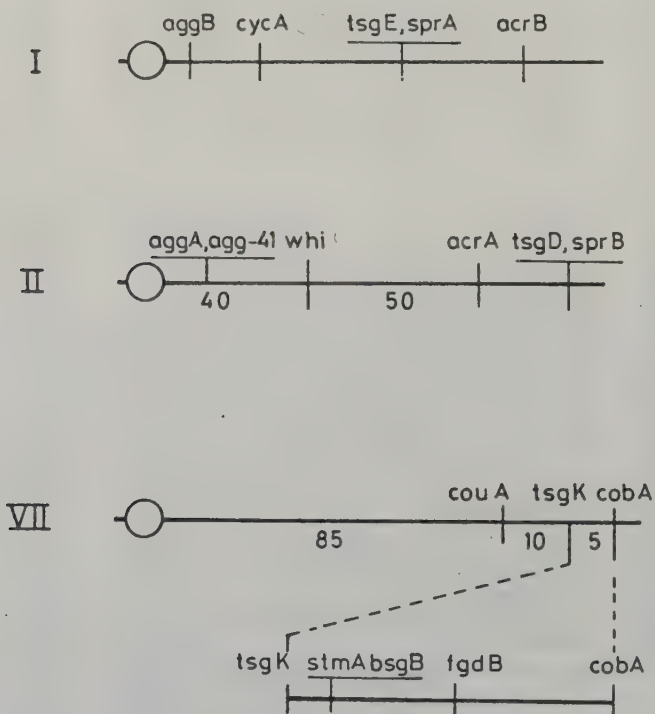


Figure 1 Map of genetic markers on *D. discoideum* linkage groups I, II and VII. The figure indicates the relative order of the markers and in the case of some of the markers on linkage groups II and VII their relative position as found from mitotic recombination studies (32,34,14 and 22).

REFERENCES

1. BARRA, J., et al. 1980. *Molec. Gen. Genet.* 177:607-613.
2. COUKELL, M.B. 1977. *Molec. Gen. Genet.* 151:275-288
3. COUKELL, M.B. Unpublished.
4. COUKELL, M.B., and N. M. ROXBY. 1977. *Molec. Gen. Genet.* 151:275-288.
5. COUKELL, M.B. and A.M. CAMERON. 1979. *J. Gen. Microbiol.* 114:247-256.
6. FREE, S.J., SCHIMKE, R.T., and W.F. LOOMIS. 1976. *Genetics* 84: 159-174.
7. GLAZER, P.M., and NEWELL, P.C. 1981. *J. Gen. Microbiol.* 125:221-232.
8. KATZ, E.R., and M. SUSSMAN. 1972. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69:495-498.
9. KESSIN, R.H., WILLIAMS, K.L., and P.C. NEWELL. 1974. *J. Bacteriol.* 119:776-783.
10. KESSIN, R.H. 1977. *Cell* 10:703-708.
11. LOOMIS, W.F. 1978. *Genetics* 88:277-284.
12. MACLEOD, C.L., and W.F. LOOMIS. 1979. *Dev. Genet.* 1:109-121.
13. MORRISSEY, J. H., WHEELER, S., and LOOMIS, W.F. 1980. *Genetics* 96:115-123.
14. MOSSES, D., WILLIAMS, K.L., AND P.C. NEWELL. 1975. *J. Gen. Microbiol.* 90:247-259.
15. NEWELL, P.C. and F.M. ROSS. 1982. *J. Gen. Microbiol.* :In Press.
16. NEWELL, P.C. ET AL. 1977. *J. Gen. Microbiol.* 100:207-211.
17. NORTH, M.J., and K.L. WILLIAMS. 1978. *J. Gen. Microbiol.* 107:223-230.
18. RATNER, D.I., and P.C. NEWELL. 1978. *J. Gen. Microbiol.* 109:225-236.
19. RAY, J., SHINNICK, T., and LERNER, R. 1979. *Nature* 279:215-221.
20. ROSS, F.M., and P.C. NEWELL. 1979. *J. Gen. Microbiol.* 115:289-300
21. ROTHMAN, F.G. and E.T. ALEXANDER. 1975. *Genetics* 80:715-731.
22. WALLACE, J.S. and NEWELL, P.C. 1982. *J. Gen. Microbiol.* In Press.
23. WELKER, D.L., and R.A. DEERING. 1976. *J. Gen. Microbiol.* 97:1-10.
24. WELKER, D.L., and R.A. DEERING. 1978. *J. Gen. Microbiol.* 109:11-23.
25. WELKER, D.L., and K.L. WILLIAMS. Unpublished.
26. WELKER, D.L. and WILLIAMS, K.L. 1980a. *FEMS Microbiol. Letters*, 9:179-183.
27. WELKER, D.L. and WILLIAMS, K.L. 1980b. *J. Gen. Microbiol.* 120:149-159.
28. WELKER, D.L. and WILLIAMS, K.L. 1980c. *J. Gen. Microbiol.* 116:397-407.
29. WELKER, D.L. and K.L. WILLIAMS 1981. *CHROMOSOMA* 82:321-332.
30. WELKER D.L. and WILLIAMS, K.L. 1982. *J. Gen. Microbiol.* In Press.
31. WILLIAMS, K.L. 1981. *FEMS Microbiol. letters*, 11:317-320.
32. WILLIAMS, K.L. KESSIN, R.H., and P.C. NEWELL. 1974. *J. Gen. Microbiol.* 84:59-69.
33. WILLIAMS, K.L., ROBSON, G.E., and WELKER, D.L. (1980). *Genetics* 95:289-304.
34. WILLIAMS, K.L., and P.C. NEWELL. 1976. *Genetics* 82:287-307.
35. WILLIAMS, K.L. and P.C. NEWELL. Unpublished.
36. WILLIAMS, K.L. and WELKER, D.L. 1980. *Dev. Genet.* 1:355-362.
37. WILLIAMS, K.L., and D.L. WELKER. Unpublished.
38. WRIGHT, M.D., WILLIAMS, K.L. and P.C. NEWELL. 1977. *J. Gen. Microbiol.* 102:423-426.

8.2 Liste der Wildtypstämme

Stamm	isoliert von
-------	--------------

NC4	Raper, 1933
V12	Raper, 1937
Ohio	Francis
WS380B	Raper
WS526	Raper
WS584	Raper

Informationen über den Kreuzungstyp dieser Wildtypstämme, sind der Liste der Genotypen (s.u.) und Robson & Williams, 1980 zu entnehmen.

Die Wildtypstämme WS526 und WS584 sind etwas cobaltresistent.

8.3 Genotypen der Dictyostelium discoideum-Stämme

Stamm	Eltern- stamm (-stämme)	I	II	III	IV	VI	VII	?
NC4								matA1
V12			sprB2					matA2
WS380B								matA366
WS526								mat-368
WS584								mat-367 cob-373
AX1	NC4							matA1 axe-373
AX2	AX1		axeA2 axeC2 oaaA2	axeB2				matA1
AX3	AX1		axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1				matA1
HU32	NP81		axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1 tsgA1	bwnA1 ebra1			matA1 cob-354

	I	II	III	IV	VI	VII	?
HU485	AX3	axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1				metaA1 whi-351
HU526	cycA1 enhA351?		bsgA5	bwnA1	mana2		metaA1
HU892	cycA1 enhA351	whiA1 tsgD12 acrA1	bsgA5	bwnA1	mana1? mana2?	tsgK21 couA351 frtB353	metaA1
HU913	radA20	whiA1 tsgD12 acrA1	bsgA5	bwnA1	mana1? mana2?		metaA1 mutA351?
HU978	HU32	axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1 tsgA1	bwnA1 ebra1			metaA1
HU1048	AX3	axeA1 axeC1 oaaA1 T360	axeB1 tsg-370 couJ360				metaA1
HU1180	AX2	axeA2 axeC2 oaaA2	axeB2				metaA1 cob-380
HU1231	NP84	sprB2	tsgN350				meta2 axe-352 axe-374 slg-352?

	I	II	III	IV	VI	VII	?
M28	tsgE13 sprA1 sclA355		radE100	bwnA1			matA1 ben-360
NP2		axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1 tsgA1				matA1
NP73		sprB2					matA2 axe-352
NP81		axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1 tsgA1	bwnA1 ebrA1			matA1
NP84		sprB2	tsgN350				matA2 axe-352 slg-352
NP161		sprB2	tsgN350				matA2 axe-352 cyc-6
X2	DP3 M28 x NP2	axeA1 axeC1 oaaA1	axeB1 tsgA1	bwnA1			matA1
XP64		cycA1 oder cycA5	bsgA5		manA2	cobA1	matA1

Lebenslauf

- 4.5.1955 geboren in Großsteinhausen, Kr. Pirmasens.
- 1962-1966 Besuch der Grundschule in Zweibrücken.
- 1966-1973 Besuch des Staatl. Neusprachl. und Math.-Naturwiss. Gymnasiums Zweibrücken;
Abschluß mit dem Abitur.
- 1973-1979 Studium der Biologie an der Universität Stuttgart-Hohenheim, mit den Studienschwerpunkten Botanik, Pflanzenphysiologie, Biochemie und Pflanzenökologie.
- 1978-1979 Durchführung der Diplomarbeit mit dem Thema "Schwermetallwirkungen auf den Kautsky-Effekt verschiedenen Chlorella-Arten" unter der Betreuung von Prof. Dr. U. Arndt im Institut für Landeskultur und Pflanzenkultur der Universität Hohenheim;
- 1979 Abschluß des Studiums mit dem Diplom.
- Ende 1979 mehrmonatiger Gastaufenthalt in der Environmental Biology Group, Boyce Thompson Institute for Plant Research at Cornell University, Ithaca, New York; Zusammenarbeit mit Dr. R. Alscher-Herman an den Effekten von SO_2 auf die Lichtaktivierung verschiedener Enzyme des Calvinzyklus in den Chloroplasten der Sojabohne.
- Mitte 1980 Beginn des Arbeitens an Dictyostelium discoideum in der Nachwuchsgruppe Entwicklungs-genetik im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried;
- Jan. 1981-1984 Durchführung der Doktorarbeit mit dem Thema "Endogene Plasmide in Dictyostelium discoideum" unter Anleitung von Dr. K.L. Williams.

